

Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

Untersuchungen von inter- und intramolekularen Interaktionen des globalen Regulators AbrB und dessen Antirepressors AbbA

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Dipl.-Biol. Svetlana Neubauer

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrick Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Stefan Hecht, Ph.D

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Rainer Borriß
2. Prof. Dr. Thomas Eitinger
3. Prof. Dr. Annegret Wilde

Datum der Promotion: 12.12.2013

Zusammenfassung

In früheren Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass der Bindung des Regulatorproteins AbrB an den *phyC*-(Phytase)-Promotor von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 ein komplexer Mechanismus zur Grunde liegen muss. Dabei verlangt die AbrB-vermittelte Repression der *phyC*-Expression nach der Integrität zweier ausgedehnter AbrB-Bindungsstellen, ABS1 und ABS2, die 162 bp voneinander entfernt liegen. Zusätzlich konnte abgeleitet werden, dass wahrscheinlich mehrere AbrB-Tetramere kooperativ an diese ausgedehnte Ziel-DNA von *phyC* binden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die ersten Echtzeit-Kinetiken zur DNA-AbrB-Interaktion mittels der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) gemessen und analysiert. Sowohl das AbrB als auch seine N-terminale DNA-bindende Domäne (AbrBN) zeigten sehr hohe Affinitäten zu den 40 bp langen Oligonukleotiden, die den beiden AbrB-Bindungsstellen entstammen. Dabei verursachten alle Oligonukleotide der ABS2 und nur eine kurze Region (Kernregion) innerhalb der ABS1 bei der Bindung von AbrB Konformationsänderungen im Protein und in der DNA (Zirkulardichroismus-Spektroskopie) und wiesen eine Kooperativität von $2 < n_{\text{Hill}} < 4$ mit einer Stöchiometrie von 2:1 (DNA:AbrB-Tetramer) auf (SPR). Den chemischen Interferenz-Footprints zufolge lagen alle AbrB-Kontakte innerhalb der Kernregion auf derselben Seite der DNA-Helix. Hier waren hauptsächlich Thymine und Guanine für den direkten Kontakt mit AbrB von Bedeutung.

Eines der Ziele dieser Arbeit bestand zudem darin, die Funktion des AbrB-Antirepressors, des AbbA, zu untersuchen. Dabei konnte experimentell belegt werden, dass AbbA als Kompetitor der DNA fungiert: AbbA verdrängt konzentrationsabhängig den Transkriptionsrepressor AbrB von der *phyC*-DNA, wobei DNA und AbbA um dieselbe Bindungsstelle im AbrB-Tetramer konkurrieren. Aus den Bindungskinetiken von AbrB und AbbA konnte eine negative Kooperativität abgeleitet werden.

Ferner konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die C-terminalen Domänen von AbrB mehrere Funktionen besitzen. In Abwesenheit des C-Terminus zeigte AbrB keine kooperativen Effekte, weder bei der Bindung an DNA noch an AbbA. Die C-terminalen Substitutionsmutanten von AbrB zeigten im Vergleich zum WT-AbrB veränderte Bindungseigenschaften gegenüber der *phyC*-Promotorregion. Die kooperativen Effekte scheinen eine wesentliche Rolle bei der AbrB-DNA-Wechselwirkung zu spielen. Die Bindung an kurze DNA-Sequenzen, wie an *sinIR*, erforderte keine kooperativen Interaktionen der C-terminalen Domäne.

Im Rahmen der Arbeit gelang es zudem, die bislang unbekannten Proteinstrukturen von AbbA und darüber hinaus des gesamten AbrB-Proteins mittels Kleinwinkelstreuung der Röntgenstrahlung (SAXS) aufzuklären.

Abstract

In previous binding studies it could be demonstrated that AbrB and the *phyC* promoter of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 interact in a complex manner. The integrity of both AbrB-binding sites, ABS1 and ABS2, which are separated by 162 bp, is crucial for the AbrB-mediated repression of *phyC* expression. Furthermore it is likely that many AbrB tetramers cooperatively interact with extensive targets like the *phyC* promoter.

This work presents the first extensive real-time binding kinetic studies of the AbrB-DNA interaction using surface plasmon resonance (SPR) and structural analysis of both AbrB and DNA in the complex using circular dichroism spectroscopy (CD). Both proteins AbrB and its N-terminal DNA-binding domain AbrBN exhibited high affinities to all analyzed 40-bp oligonucleotides that were derived from the ABSs of *phyC*. All parts of the ABS2, but only a small region (core region) within ABS1, were bound cooperatively to AbrB with a stoichiometry of 2:1 (DNA:AbrB tetramer) and a Hill-coefficient of $2 < n_{\text{Hill}} < 4$ inducing conformational changes of the protein and DNA. Using chemical interference footprints cumulative bases contacting AbrB were primarily determined at one face of the DNA-helix. The bases, mainly thymines and guanines, within the core region seemed to be responsible for direct contacts to AbrB.

In addition, this work presents also an extensive analysis of the AbrB antirepressor AbbA. Addition of AbbA to the AbrB-*phyC* complex resulted in the dissociation of the complex and the release of unbound DNA in a concentration-dependent manner. Furthermore DNA and AbbA compete for the same binding site of AbrB tetramer. The AbrB-AbbA binding kinetics indicated a negative cooperativity. Thus AbbA acts as a competitor of the DNA.

Moreover, in the present work it could be demonstrated that the C-terminal domains of AbrB exhibit multiple functions. In the absence of the C-termini AbrB showed no cooperative behaviour neither in binding with DNA nor with AbbA. AbrB proteins with substitutions within the C-terminus resulted in altered binding properties towards *phyC* promoter region when compared to native AbrB. The cooperativity is ensured by the C-termini and unambiguously plays a significant role in AbrB-DNA interactions. However, AbrB-binding at short sequences like *sinIR* does not necessarily require cooperative interactions of C-terminal domains.

Finally, this work presents the first low-resolution structural characterization (small angle X-ray scattering) of the proteins AbbA and particularly of the full-length AbrB, the structures of which were so far unknown.

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. bidest</i>	zweifach entionisiertes Wasser
AbrB bzw. AbbA BA	AbrB bzw. AbbA aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB45
AbrB bzw. AbbA BS	AbrB bzw. AbbA aus <i>Bacillus subtilis</i> 168
ABS/ABSs	AbrB-Bindungsstelle/ AbrB-Bindungsstellen
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
[γ - ³² P]-ATP	[Gamma-P32] Adenosin-5'-triphosphat
AS	Aminosäure/n
<i>B. a.</i> bzw. <i>B. s.</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> bzw. <i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CD	Zirkulardichroismus
DTT	Dithiothreitol
ECF	extracytoplasmatische Funktion
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Gelretardations-Assays (<u>E</u> lectrophoretic <u>M</u> obility <u>S</u> hift <u>A</u> ssay)
EtOH	Ethanol
FPLC	Fast protein liquid chromatography
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
Km	Kanamycin
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
RNAP	RNA-Polymerase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Response Units</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSRs	<i>transition-state regulators</i>
ÜN	über Nacht
[α - ³² P]-UTP	[Alpha-P32] Uridin-5'-triphosphat
VE-Wasser	deionisiertes Wasser

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	AbrB – ein globaler Regulator der transienten Phase	1
1.1.1	Überlappende Regulons der TSRs	3
1.1.2	AbbA - der AbrB-Antirepressor	5
1.1.3	Zielgene von AbrB und AbrB-Bindungsstellen	6
1.1.4	Nukleoid-assoziierte Proteine	8
1.2	Die Eigenschaften von AbrB	10
1.2.1	DNA-bindende Domäne - Struktur und Funktion	10
1.2.2	Die Superfamilie der AbrB-ähnlichen Transkriptionsfaktoren	12
1.2.3	Die C-terminale Domäne von AbrB-ähnlichen Proteinen	14
1.3	Phytase – ein Zielgen von AbrB	15
1.3.1	Bedeutung von Phytasen	15
1.3.2	Regulation von <i>phyC</i> in <i>Bacilli</i>	16
1.3.2.1	<i>phyC</i> -Promotor von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB45	16
1.3.2.2	Regulatorproteine von <i>phyC</i> _{FZB45}	17
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	18
2	Ergebnisse und Auswertungen	21
2.1	SPR-(<i>Surface Plasmon Resonance</i>)–Bindungsstudien	21
2.1.1	Vorbereitung der AbrB-Sensorchips	21
2.1.1.1	AbrB-Sensorchips für Kinetiken mit ds-DNA-Oligonukleotiden	21
2.1.1.2	AbrB-Sensorchips für Kinetiken mit AbbA	22
2.1.2	Bindungsparameter der Interaktion von ds-Oligonukleotiden mit AbrB und AbrBN	22
2.1.2.1	Bindungskinetik der Oligonukleotide mit AbrB und AbrBN	22
2.1.2.2	Auswertung der Dissoziationskonstanten aus den SPR-Daten	25
2.1.2.3	Auswertung der kinetischen Parameter	27
2.1.2.4	Auswertung der Hill-Koeffizienten	30
2.1.2.5	Stöchiometrie der Komplexe	31
2.1.3	Bindungsparameter der Interaktion von AbrB mit dem Antirepressor AbbA	32
2.1.3.1	Kinetische Analysen der AbrB- und AbbA-Interaktionen	32
2.1.3.2	Parameter der negativen Kooperativität	35
2.2	<i>In vitro</i> Bindungsuntersuchungen von AbrB und AbbA	38
2.2.1	Chemische Interferenz-Footprintanalysen	38
2.2.1.1	Mapping der Kontaktstellen innerhalb der ABS1	40
2.2.1.2	Mapping der Kontaktstellen innerhalb der ABS2	42
2.2.2	Auswirkung der ABS1-Kernregion auf die Transkription	44
2.2.3	Substitutionsanalysen der C-terminalen Domäne von AbrB	45
2.2.3.1	Selektion von Aminosäuren zur Substitution	46
2.2.3.2	Polymerisierungsformen der substituierten AbrB-Proteine	47
2.2.3.3	Bindungsassays der AbrB-Derivate mit dem <i>phyC</i> -Promotor	49

2.2.3.4	Bindungsassays der AbrB-Derivate mit dem <i>sinIR</i> -Promotor	51
2.2.4	AbrB-AbbA-Wechselwirkung und Einfluss auf die DNA-Bindung	53
2.2.4.1	Native Gele zur Analyse der AbrB-AbbA-Interaktionen.....	53
2.2.4.2	AbbA hemmt die Bindung von AbrB an den <i>phyC</i> -Promotor	55
2.3	Zirkulardichroismus-Bindungsstudien	56
2.3.1	Bindungsuntersuchungen der ds-Oligonukleotide mit AbrB und AbrBN	56
2.3.2	Sekundärstrukturen der AbrB- und AbbA-Proteine	60
2.3.2.1	Sekundärstruktur von AbrB und der C-terminalen Domäne	61
2.3.2.2	Sekundärstruktur von AbbA	64
2.3.3	Auswirkung von AbbA auf die AbrB-DNA-Interaktion	65
2.4	SAXS-Strukturen	66
2.4.1	Auswertung der SAXS-Messdaten	66
2.4.2	SAXS-Struktur von AbrB und AbrBN	69
2.4.3	SAXS-Struktur von AbbA	72
3	Diskussion	75
3.1	Kernregion innerhalb ABS1 des <i>phyC</i> -Gens.....	75
3.2	Konsensus-ähnliche Motive	76
3.3	Kooperativität als allgemeiner Mechanismus?	77
3.3.1	Kooperativität zwischen AbrB-Bindungsstellen im <i>phyC</i> -Gen.....	77
3.3.2	Positive Kooperativität innerhalb des AbrB-Tetramers	79
3.4	Hochorganisierte DNA-Strukturen	80
3.4.1	AbrB – ein Nukleoid-assoziiertes Protein?	80
3.4.1.1	Triplex-Strukturen als Motiv?	83
3.5	Vielfache Funktionen der C-terminalen Domäne.....	84
3.5.1	DNA-bindende Aktivität?	84
3.5.2	Interagiert der C-Terminus von AbrB direkt mit der DNA?.....	86
3.5.3	Verleihen die C-Termini dem AbrB-Tetramer die Flexibilität?	87
3.6	Neue Rolle des konservierten Arginin-Restes R15.....	88
3.7	Kompetitive Hemmung der <i>phyC</i> -AbrB-Interaktion	88
3.8	Modell zur Regulation der <i>phyC</i> -Transkription.....	91
4	Material	95
4.1	Plasmide	95
4.2	Stämme	96
4.3	Oligonukleotide und Nukleotide.....	97
4.4	Weitere Enzyme und Proteine	100
4.5	Antibiotika.....	101
4.6	Größenstandards	102
4.7	Puffer, Lösungen, Fertigreagenzien.....	102
4.8	Medien.....	105
4.9	Kommerzielle Kit-Systeme.....	106
4.10	Geräte und Materialien	106
4.11	Software, Programme.....	108

5 Methoden	111
5.1 Mikrobiologische Methoden	111
5.1.1 Stammhaltung von Bakterienkulturen.....	111
5.1.2 Kultivierung	111
5.1.2.1 Zellkulturen für Proteinreinigung.....	111
5.1.2.2 Herstellung Ca ²⁺ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	111
5.1.2.3 Transformation der Ca ²⁺ -kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	112
5.1.2.4 Herstellung elektroporationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	112
5.1.2.5 Transformation elektroporationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	112
5.1.2.6 Transformation XL10-Gold ultrakompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	112
5.2 Gentechnische Methoden	113
5.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Bacillus</i>	113
5.2.2 Plasmidpräparationen.....	113
5.2.2.1 Spin-Plasmidpräparation	113
5.2.2.2 Midi-Plasmidpräparation	113
5.2.3 Reinigung der Nukleinsäuren	113
5.2.3.1 Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Agarose-Gel	113
5.2.3.2 Reinigung der Nukleinsäuren aus wäßrigen Lösungen	114
5.2.4 Bestimmung der Qualität und der Quantität von Nukleinsäuren.....	114
5.2.5 DNA-Restriktionen.....	114
5.2.6 Dephosphorylierung der DNA	114
5.2.7 Ligation von DNA.....	115
5.2.8 DNA-Fällungen.....	115
5.2.8.1 NaAcetat/Ethanol-Fällung	115
5.2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction - PCR).....	115
5.2.9.1 Standard-PCR.....	115
5.2.9.2 Kolonie-PCR	116
5.2.9.3 Ortsspezifische Mutagenese	116
5.2.10 Konstruktion von Plasmiden und Stämmen.....	117
5.2.10.1 pABRB-Plasmidderivate	117
5.2.10.2 pABBA-Expressionsplasmide.....	117
5.2.10.3 pSN1-Plasmide	117
5.2.11 Markierung der DNA.....	118
5.2.12 Gelretardationsassay	118
5.2.12.1 Analytische Gelretardationsassay	118
5.2.12.2 Präparative Gelretardationsassay	119
5.2.13 <i>In vitro</i> Transkription	119
5.2.14 Chemische Interferenz-Footprintanalyse.....	120
5.2.14.1 Grundlagen der Modifikation von Guanin und Adenin mittels Dimethylsulfat	120
5.2.14.2 Interferenz-Footprinting durch Methylierung	121
5.2.14.3 Grundlagen der Modifikation der Thymine mittels Kaliumpermanganat.	121
5.2.14.4 Interferenz-Footprinting durch Kaliumpermanganat	122

5.2.14.5	Grundlagen der Modifikation der Cytosine mittels Hydroxylamin.....	123
5.2.14.6	Interferenz-Footprinting durch Hydroxylamin.....	124
5.3	Biochemische Methoden	124
5.3.1	Reinigung der Proteine	124
5.3.1.1	Zellaufschluss mit Ultraschall	124
5.3.1.2	Reinigung His-getaggtter Proteine mittels Qiagen Ni ²⁺ -NTA-Agarose.....	124
5.3.1.3	Reinigung His-getaggtter Proteine mittels Protino Ni-TED 1000	125
5.3.1.4	Proteinreinigung durch präparative Gelfiltration mittels FPLC	126
5.3.1.5	Reinigung der RNA-Polymerase.....	126
5.3.1.6	Dialyse von Proteinlösungen	127
5.3.2	Proteinbestimmung.....	127
5.3.2.1	Bestimmung nach Bradford	127
5.3.2.2	UV-Proteinbestimmung bei 280 nm (NanoDrop).....	127
5.3.2.3	Bestimmung der molekularen Masse mittels analytischer Gelfiltration ..	128
5.3.3	Protein-Elektrophorese und Protein-Färbung	129
5.3.3.1	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	129
5.3.3.2	Native Proteingele	129
5.3.3.3	Protein-Färbung	129
5.3.3.3.1	Coomassie-Färbung.....	129
5.3.3.3.2	Page Blue Protein Staining Solution.....	130
5.3.4	Thrombinverdau zur Entfernung des His-Tags.....	130
5.3.5	Western Blot	130
5.3.6	Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technik (<i>Surface Plasmon Resonance</i> – SPR)	131
5.3.6.1	Grundlagen der SPR-Technik	131
5.3.6.2	Präparation von doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden	132
5.3.6.3	Immobilisierung der AbrB-Proteine an den CM5-Sensorchip.....	132
5.3.6.3.1	Vorbereitung von AbrB-Sensorchip für die Bindungsstudien mit ds- Oligonukleotiden.....	132
5.3.6.3.2	Vorbereitung von AbrB-Sensorchip für die Bindungsstudien mit AbbA.	133
5.3.6.4	SPR-Messungen: AbrB-Bindungsassays	134
5.3.6.4.1	Bindungsstudien zwischen dem AbrB-Protein und den ds-DNA- Oligonukleotiden.....	134
5.3.6.4.2	Bindungsstudien zwischen den AbrB- und AbbA-Proteinen	135
5.3.6.5	Datenauswertung mit der BIAevaluation-Software.....	135
5.3.7	Spektroskopische Untersuchungen	137
5.3.7.1	Tyrosin-Fluoreszenz-Emission	137
5.3.7.2	Zirkulardichroismus (CD).....	138
5.3.7.2.1	Grundlagen von Zirkulardichroismus.....	138
5.3.7.2.2	CD-Messungen.....	140
5.3.8	Kleinwinkelröntgenstreuung (<i>Small Angle X-Ray Scattering</i> - SAXS)	141
5.3.8.1	Deutsches Elektronen-Synchrotron - DESY	141
5.3.8.2	Grundlagen des Streuprozesses	141

5.3.8.3	Streuung an Proteinen.....	142
5.3.8.4	Aufreinigung der Proteine für SAXS-Messungen.....	142
5.3.8.5	SAXS-Messungen an der X33-Strahllinie (DORIS III, Hamburg).....	143
6	Referenzen	145
7	Anhang	155
7.1	Klonierung und Proteinreinigung.....	155
7.1.1	Expressionsplasmide	155
7.2	Klonierung: Plasmidkonstruktion.....	156
7.2.1	Konstruktion der pABBA-Plasmide.....	156
7.2.2	Konstruktion des pABRB-Plasmids und dessen Derivate	157
7.2.3	Konstruktion des pSN1-Plasmids.....	159
7.2.4	SDS-PAGE-Reinigungsgele.....	159
7.2.5	Proteinreinigung über präparative Gelfiltration als Vorbereitung für SAXS- und CD-Messungen.....	161
7.2.6	Western Blot zum Nachweis des His ₆ -Tags	162
7.2.7	UV-Proteinbestimmung bei 280 nm.....	163
7.3	<i>Surface Plasmon Resonance</i> – SPR	164
7.3.1	Bindungsreaktionen der ds-Oligonukleotide mit AbrB-Proteinen.....	164
7.3.2	Bindungsreaktionen von AbrB mit seinem Antirepressor AbbA.....	165
7.4	Zirkulardichroismus	167
7.4.1	Zusatzmaterial: Tabellen und Abbildungen	167
7.5	Mutagenese der C-terminalen Domäne.....	169
7.5.1	Bindungsuntersuchungen der <i>sinIR</i> -P1 mit AbrB-Varianten.....	169
7.5.2	Quantifizierung der Gel-Shift-Assays	169
7.5.3	Polymere Formen der AbrB-Varianten	170
7.6	AbrB-AbbA-Interaktionen	171
7.6.1	Gelretardationsassays der <i>phyC</i> -Promotorregion.....	171
7.7	<i>In vitro</i> Transkription.....	171
7.8	Zusatzmaterial	172
7.8.1	Untersuchung der <i>phyC</i> -Zwischenregion bei AbrB- <i>phyC</i> -Interaktionen	172
7.8.2	Fluoreszenz	173

1 Einleitung

AbrB (*antibiotic resistance protein B*) ist ein globaler Regulator der transienten Wachstumsphase, der über 100 Gene in *Bacillus*-Arten reguliert. AbrB wirkt hauptsächlich als Transkriptionsrepressor. Es sind nur wenige Gene bekannt, die durch AbrB aktiviert werden. Obwohl dieses Protein in die Regulation der meisten zellulären Prozesse als Repressor involviert ist, konnte der AbrB-vermittelte Regulationsmechanismus bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden. Und obwohl das AbrB spezifisch mit zahlreichen DNA-Bereichen interagiert, wurde bislang auch keine Konsensus-Sequenz für die AbrB-Bindungsstellen abgeleitet. Es wird daher angenommen, dass AbrB sehr wahrscheinlich spezifische lokale Strukturmerkmale der DNA-Helix erkennen kann. Seit kurzem wird dem AbrB und seinem Paralogen, Abh, eine mögliche Rolle in der Nukleoid-Organisation zugeschrieben, ähnlich wie den kleinen basischen H-NS-Proteinen in *Escherichia coli*.

AbrB ist ein kleines Protein (10,5 kDa; 94 Aminosäuren), das aus zwei Domänen besteht. Seine spezifische DNA-Erkennung und -Bindung wird durch die N-terminalen DNA-bindenden Domänen vermittelt. Die beiden N-Termini formen eine dimere *swapped-hairpin* β -barrel-Struktur. Die Struktur der C-terminalen Domänen von AbrB ist bislang nicht bekannt, aber es wird angenommen, dass diese nur für die Tetramerisierungsaktivität des Proteins zuständig sind. Über weitere Funktionen der C-Termini, wie die Bedeutung für die DNA-bindende Aktivität, kann bis lang nur spekuliert werden.

1.1 AbrB – ein globaler Regulator der transienten Phase

Bodenbakterien wie *Bacillus subtilis* und enge Verwandte unterliegen permanenten Veränderungen der Umweltbedingungen, wie Temperatur, Feuchtigkeit, Nährstoffangebot, Sauerstoffverfügbarkeit, pH-Wert des Bodens und osmotischem Druck (Msadek 1999). Eine schnelle und gezielte Anpassung an eine spezifische Stresssituation sichert daher das Überleben. Das Wachstumsstadium, in dem die Zelle über eine passende Antwort auf den Umweltstress entscheidet, wird als transiente Phase bezeichnet. Diese Phase ist der Übergang vom aktiven, exponentialen Wachstum in die stationäre Phase und wird durch die unterschiedlichen globalen Regulatorproteine (TSRs; *transition-state regulators*) kontrolliert. Ein solcher Regulator in *E. coli* ist der Transkriptionsfaktor der generellen Stressantwort σ^S (Lange *et al.* 1994, Hengge-Aronis 1999). Das sporenbildende Bakterium *B. subtilis* reguliert den Übergang in die stationäre Wachstumsphase durch mehrere DNA-bindende Regulatorproteine, wie CodY (Sonenshein 2005), σ^B (Boylan *et al.* 1993), σ^H (Britton *et al.* 2002), SinR (Shafikhani *et al.* 2002), Hpr (auch ScoC genannt) (Perego *et*

al. 1988), AbrB (Strauch *et al.* 1993), Abh (Phillips *et al.* 2002) und Spo0A~P (Hoch 1993) (Abbildung 1.1 B). Der am besten analysierte TSR ist das pleiotropische AbrB-Protein (Strauch *et al.* 1993). Seine Hauptfunktion liegt darin, die Expression von bestimmten postexponentiellen Genen während des aktiven (replikativen) Wachstums von *B. subtilis* zu verhindern. Das sind über 100 Gene, die in die unterschiedlichsten Zellfunktionen (Abbildung 1.1 A) wie die Produktion der Antibiotika (Marahiel *et al.* 1993, Phillips *et al.* 2002) und der antimikrobiellen Substanzen (Strauch *et al.* 2007), den Kannibalismus (Fujita *et al.* 2005), die Produktion von extrazellulären Proteasen und anderen degradativen Enzymen (Phillips *et al.* 2002), die Bildung von Biofilmen (Hamon *et al.* 2004), die Ausbildung der Kompetenz (Hamon *et al.* 2003), die Initiation der Sporulation (Zuber *et al.* 1987, Shafikhani *et al.* 2004) und bei *Bacillus anthracis* (Saile *et al.* 2002) bzw. *Bacillus cereus* (Saile *et al.* 2002) in die Expression der Toxine involviert sind. Das AbrB wirkt hauptsächlich als Repressor, nur wenige Gene sind bekannt, die aktiviert werden. Dazu gehören die Gene für den Ribosetransport (Strauch 1995a), Hpr (Strauch *et al.* 1989b), Akonitase (Kim *et al.* 2003), Histidase (Fisher *et al.* 1994), Flagellinsynthesegene (Mirel *et al.* 2000) und das Zweikomponentensystem der Phosphatmangelantwort *phoPR* (Sun *et al.* 1996).

Die Konzentration von AbrB in der Zelle unterliegt mindestens zwei Kontrollmechanismen: I) der Repression durch das Spo0A-Protein, einem Hauptregulator für die Initiation der Sporulation, und II) einer Form der Autoregulation (Perego *et al.* 1988, Strauch *et al.* 1989b). Die Expression von AbrB ist abhängig von der Wachstumsphase. Während der exponentiellen Phase wird die intrazelluläre Konzentration des aktiven AbrB-Proteins in erster Linie durch die Autoregulation auf einem kritischen Grenzspiegel aufrechterhalten (Strauch *et al.* 1989a, Strauch *et al.* 1993). Beim Eintritt in die stationäre Phase wird Spo0A über eine Phosphorylierungskaskade aktiviert. Die *abrB*-Transkription wird durch Spo0A~P sehr effektiv gehemmt, was die intrazelluläre AbrB-Konzentration stark herabsetzt (Strauch *et al.* 1989a, Strauch *et al.* 1990). Der *downstream*-liegende *abrB*-P2-Promotor wird durch beide Proteine, AbrB und Spo0A~P, reguliert, wohingegen der *abrB*-P1-Promotor der alleinigen AbrB-Kontrolle unterliegt.

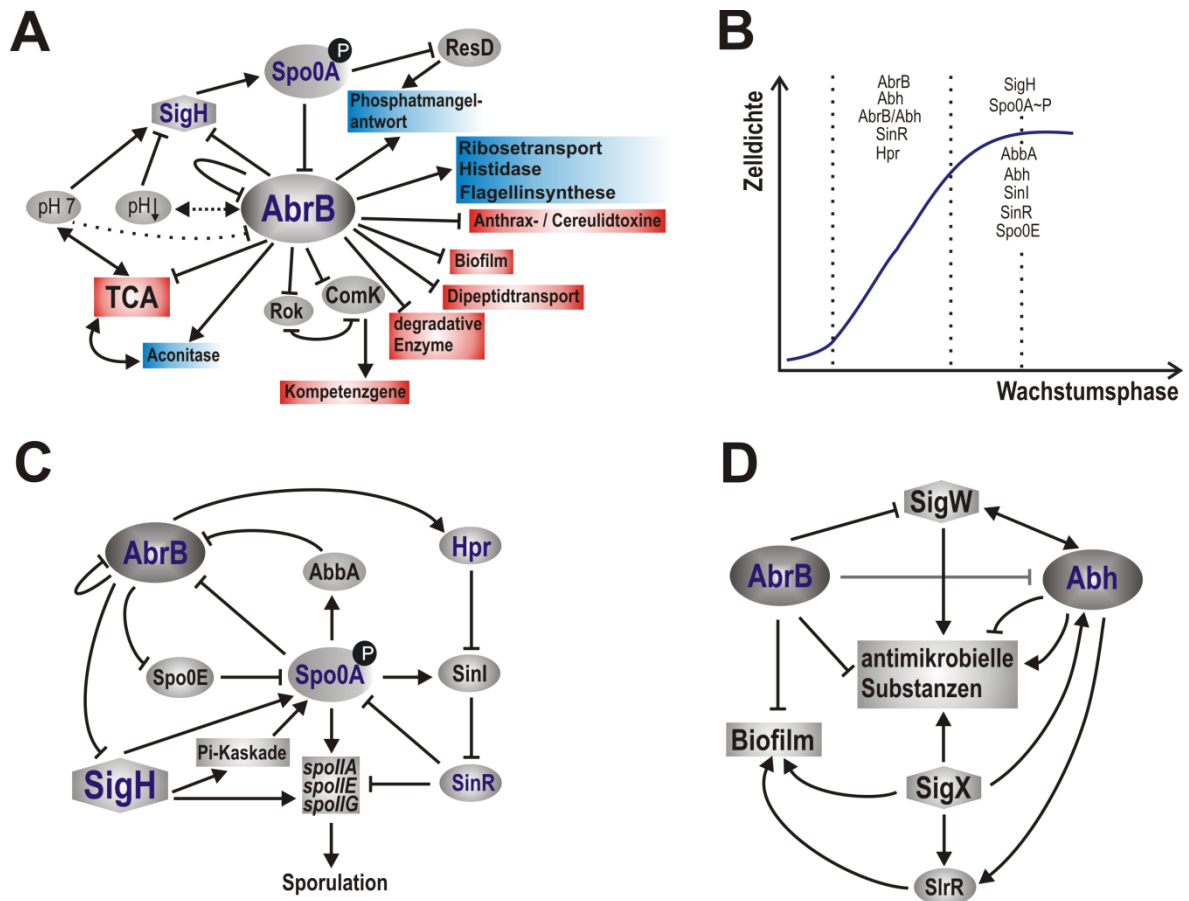


Abbildung 1.1: Regulation des Übergangs in die stationäre Wachstumsphase durch AbrB im sporenbildenden Bakterium *Bacillus subtilis*.

(A) AbrB kontrolliert viele Gene der transienten Phase, die in unterschiedliche Zellfunktionen involviert sind. ResDE und PhoPR sind Zwei-Komponenten-Systeme der respiratorischen und der Phosphatmangelantwort. AbrB und ResD~P sind positive Regulatoren von *phoPR*, deren Expression durch Spo0A~P gehemmt wird (Msadek 1999). Die Expressionen der Anthrax-Toxine in *B. anthracis* bzw. Cereulid-Toxine in *B. cereus* werden ebenfalls durch AbrB kontrolliert (Saile *et al.* 2002, Lucking *et al.* 2009). (B) Die Expression und die Aktivität von TSRs und den *checkpoint*-Proteinen sind abhängig von der Wachstumsphase. (C) AbrB kontrolliert viele Gene indirekt, indem es weitere *transition-state* Regulatoren wie Hpr, SinR, Abh und SigH reguliert. Hpr unterdrückt während der vegetativen Wachstumsphase die Expression von SinI. In der stationären Phase wird SinI stark exprimiert und wirkt somit dem Sporulationsrepressor SinR posttranslational entgegen (Gaur *et al.* 1988). SinR ist aktiv während des vegetativen Wachstums und am Beginn der stationären Phase. SinR hemmt das *spo0A*-Gen und die wichtigen Gene der späten Sporulationsphase (*spoIIA*, *spoIIG*, *spoIIE*). Die durch Spo0A~P verursachte intrazelluläre AbrB-Konzentrationsabnahme führt zur Akkumulation der Spo0E-Phosphatase, die den Phosphatrest von Spo0A~P entfernt und dadurch Spo0A inaktiviert (Strauch *et al.* 1993, Shafikhani *et al.* 2004). (D) Das AbrB und sein paralogenes Protein Abh weisen überlappende Regulons auf. SigW und SigX sind alternative Sigmafaktoren, welche Gene mit extracytoplasmatischer Funktion (ECF) kontrollieren. Expression der antimikrobiellen Substanzen wird durch Abh entweder positiv (*sunA*) oder negativ (*skfA*, *sdpA*) reguliert (Strauch *et al.* 2007, Luo *et al.* 2009). Positive Regulation ist mit →, negative mit ⊥ gekennzeichnet.

1.1.1 Überlappende Regulons der TSRs

Im Gegensatz zu *E. coli*-Bakterien, die einen eher stabilen Lebensraum bewohnen, werden bei *B. subtilis* viele Gene, die beim Eintritt in die stationäre Phase exprimiert werden, durch mehrere *transition-state* Regulatoren (TSRs) kontrolliert (Msadek 1999,

Phillips *et al.* 2002) (Abbildung 1.1 B und C). Dabei ist die Regulation sehr fein abgestimmt und die einzelnen TSRs können sehr unterschiedliche Effekte auf die Genexpression haben. So zum Beispiel wird die Flagellinsynthese durch die drei Regulatoren Hpr, SinR und AbrB positiv (Mirel *et al.* 2000) und die Subtilisin- (*aprE*)-Synthese (Shafikhani *et al.* 2002) negativ reguliert, obwohl *aprE* durch das AbrB-Paralogon Abh positiv reguliert wird. Ein anderes Beispiel ist die Kompetenz, die während der aktiven Wachstumsphase durch AbrB negativ reguliert wird (Hamoen *et al.* 2003) und am Beginn der stationären Phase einer positiven Kontrolle durch SinR unterliegt (Shafikhani *et al.* 2002).

Das AbrB und sein paraloges Protein Abh regulieren teilweise zusammen und überlappend viele Gene (Strauch *et al.* 2007). Eine *in silico* genomweite Bindungsanalyse in *B. subtilis* lieferte 390 überlappende AbrB/Abh-Bindungsstellen (Chumsakul *et al.* 2011). Von diesen wurde bislang die Expression einiger σ^W -abhängiger Gene für antimikrobielle Substanzen untersucht. Die negative Regulation dieser Gene durch AbrB erfolgt entweder direkt oder indirekt über die Hemmung der σ^W -Expression (Abbildung 1.1 D). Die *abh*-Expression selbst unterliegt bis zu einem gewissen Grad der AbrB-Repression (Strauch *et al.* 2007). Die *abh*-Transkription ist abhängig von ECF-Sigmafaktoren σ^W , σ^X und σ^M (Qian *et al.* 2002, Luo *et al.* 2009, Murray *et al.* 2009). Die durch das AbrB reprimierten Gene, wie *sunA* (Presublancin als antimikrobielle Substanz), *aprE* (Subtilisin), *sigW* (σ^W -Faktor) und *slrR* (Aktivator der Biofilmproduktion), werden durch Abh während der späten exponentiellen und der frühen stationären Phase aktiviert (Murray *et al.* 2009). Die beiden Proteine bilden zusammen während der exponentiellen Phase sogar die AbrB/Abh-Heteromere. Die meisten Abh-Moleküle befanden sich in Komplex mit AbrB. Die Menge an Abh-Homomeren war in *abrB*⁺-Zellen niedrig (Chumsakul *et al.* 2011). Die Abh-Homomer-spezifische Bindung an Zielgene war nur in Abwesenheit von AbrB (Δ *abrB*-Zellen) nachweisbar. Das Abh scheint ein wichtiger Regulator in der stationären Phase zu sein, wenn der intrazelluläre AbrB-Spiegel deutlich abnimmt (Chumsakul *et al.* 2011).

Auch die Unterschiede in pH-abhängigen Aktivitätsprofilen von AbrB und Abh wurden beschrieben. Das *in vitro* DNA-Bindungsoptimum von Abh wurde bei pH 7 beobachtet (Bobay *et al.* 2006). Das stimmt gut mit dem neutralen pH-Wert der Zelle beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase überein (Cosby *et al.* 1997, Bobay *et al.* 2006). Der neutrale pH-Wert, der für die Stabilität des σ^H -Proteins erforderlich ist, wird durch den aktiven TCA-Zyklus aufrechterhalten (Abbildung 1.1 A). Eine σ^H -abhängige RNA-Polymerase transkribiert die Gene der für die Spo0A-Aktivierung erforderlichen Phosphorylierungskaskade (*kinA*, *spo0F*), das *spo0A*-Gen und die Gene der späten

Sporulationsphase (*spoIIA*, *spoIIG*, *spoIIE*) (Abbildung 1.1 C) (Weir *et al.* 1991, Shafikhani *et al.* 2002). Während des aktiven Wachstums, wenn der Glucose-Überschuss eine Acetat-Anreicherung verursacht, wird der cytoplasmatische pH-Wert, aufgrund der Rediffusion des Acetats und der anschließenden Inonisierung innerhalb der Zelle, stark reduziert (pH ~5). Der AbrB-Gehalt bleibt bei einem niedrigen pH-Wert hoch (Abbildung 1.1 A). Das AbrB hält wiederum den niedrigen pH-Wert durch die Repression der TCA-Gene aufrecht (Cosby *et al.* 1997).

Die wichtigsten Regulatoren, die an dem so genannten *checkpoint*-Mechanismus teilnehmen, sind AbrB, Hpr und Spo0E (Abbildung 1.1 B und C). Diese verhindern den voreiligen Eintritt in die Sporulation (Shafikhani *et al.* 2002), einen irreversiblen, energieaufwendigen Prozess (Phillips *et al.* 2002), und erlauben der Zelle andere alternative Wege, solche wie Motilität, Kompetenz und die Produktion von extrazellulären degradativen Enzymen und Antibiotika (Shafikhani *et al.* 2002, Shafikhani *et al.* 2004), einzuleiten (Abbildung 1.1 C).

1.1.2 AbbA - der AbrB-Antirepressor

Eine direkte Repression von *abrB* durch Spo0A~P ist nicht der einzige Kontrollweg, der durch die Abnahme des AbrB-Spiegels zu einer Derepression der AbrB-kontrollierten Gene und des Operons in der Zelle führt. Vor kurzem wurde ein neues Protein, das AbbA, entdeckt, das als AbrB-Antirepressor wirkt (Banse *et al.* 2008). AbbA ist das Produkt des *yzkF*-Gens (neue Bezeichnung: *abbA* = *antirepressor of abrB A*), dessen Transkription durch Spo0A~P direkt aktiviert wird (Molle *et al.* 2003, Fujita *et al.* 2005). Das AbrB wird durch eine direkte Interaktion mit dem AbbA inaktiviert, wodurch seine Bindung an die DNA-Targets inhibiert wird. Gelretardationsstudien zeigten, dass AbbA die Bindungen von AbrB an die Promotorregionen von *sdp*, *skf*, *comK* und *lip* verhindert (Banse *et al.* 2008). Außerdem wurden weitere 23 Gene gefunden, deren Regulation aufgrund einer AbbA-Überexpression positiv beeinflusst wurde. Zwanzig dieser Gene unterliegen einer negativen Kontrolle durch AbrB. Die schnelle AbrB-Inaktivierung durch AbbA erscheint im Zusammenhang mit der Varianten-Vielfalt, sowie dem Kannibalismus (*sdp*, *skf*), der Kompetenz (*comK*) und der Biofilm-Ausbildung (*lip*) in der stationären Phase vorteilhaft und sinnvoll, bevor die Zelle auf den zeitaufwendigen und unumkehrbaren Prozess der Sporulation umschaltet (Banse *et al.* 2008).

Das *abbA*-Gen wurde bislang ausschließlich in grampositiven Bakterien gefunden, die in ihren Genomen das *abrB*-Gen enthalten. Obwohl das AbrB in allen Arten von *Bacillus*, *Clostridium*, *Geobacillus* und *Listeria* konserviert ist, wurde AbbA nur unter den *Bacillus*- und *Geobacillus*-Arten gefunden. In dem nicht-sporenbildenden, pathogenen Bakterium

Listeria monocytogenes der *Bacilli*-Gattung fehlen beide Regulatoren, AbbA und Spo0A. Damit müsste sich die Ablösung der AbrB-vermittelten Repression in *L. monocytogenes* von der im *B. subtilis* stark unterscheiden (Banse *et al.* 2008).

Der Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von AbbA-ähnlichen Proteinen aus den unterschiedlichen *Bacillus*-verwandten Arten (Abbildung 1.2) weisen insgesamt 22 komplett konservierte Aminosäure-Reste auf. Diese tragen viele negativ geladene Aminosäurenreste, wie Glutamat (E12-14, E30, E35, E40) und Aspartat (D38, D47), jedoch nur wenige positiv geladene Reste (K44, K52, R60). Zu weiteren stark konservierten AS-Resten gehören hydrophobe Aminosäuren mit verzweigten Seitenketten (L17-19, L22, L32, L57 und I39), sowie kleine Aminosäuren (A28, G42) und aromatische Aminosäuren mit einer Hydroxylgruppe (Y27, Y51).

	10	20	30	40	50	60
FZB42	- M S L I G E R F T E E E Q K L L L N I L I N Q E Y A I E L L T S E I N D I E A G S K S V D G T T Y K K L V T L Y D R F R N E N -					
CAU-B946	- M S L I S E R F T E E E Q K L L L N I L I N Q E Y A I E L L T S E I N D I E A G S K S V D G T T Y K K L V T L Y D R F R N E N -					
FZB45	- M S L I S E R F T E E E Q K L L L N I L I N Q E Y A I E L L T S E I N D I E A G S K S V D G T T Y K K L V T L Y D R F R N E N -					
W23	- M S L I G E R F T E E E Q K L L L N I L I N H E Y A I E L L S S E I N D I E T G T K N V D G T T Y K K L V T L Y D R F R F E N -					
168	- M R M S L I G E R F T E E E Q K L L L N I L I N H E Y A I E L L S S E I N D I E T G T K N V D G T T Y K K L V T L Y D R F R F E N -					
ATCC14580	- - - - M E R F S E E E R K L L L N V L L D H E Y A V E L L S S E I N D I E T G T K N V D S L T Y K K L V T L Y D R V R S E N -					
SAFR-032	- - - M S V I E N R F N E E E K K L L L N V L L N Q E Y A V E L L S S E I N D I E C G T K N V D D N T Y K Q L I T L Y D R V R F E N -					
1942	- - M S L I G E R F T E E E Q K L L L N V L I N H E Y A I E L L S S E I N D I E T G T K N V D G T T Y K K L V T L Y D R F R F E N -					
A0248	- - - M K R E F V L T E E E E S L L L D I L F Q Q N Y A S E I L A V E L T D I E N G L K K T D V M Q Y K K I T R L F Y R L K N K G Y					
CI	- - - M K R E F V L T E E E E S L L L D I L F Q Q N Y A S E I L A V E L T D I E N G L K K T D V M Q Y K K I T R L F Y R L K N K G Y					
F837/76	- - - M K R E F V L T E E E E S L L L D I L F Q Q N Y A S E I L A V E L T D I E N G L K K T D V M Q Y K K I T R L F Y R L K N K G Y					
Al Hakam	- - - M K R E F V L T E E E E S L L L D I L F Q Q N Y A S E I L A V E L T D I E N G L K K T D V M Q Y K K I T R L F Y R L K N K G Y					
Konsensus	M S I E R F T E E E K L L L N I L N Q E Y A E L L S E I N D I E G K V D T Y K K L V T L Y D R R N E N					

Abbildung 1.2: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von AbbA-Proteinen aus *Bacillus*-Arten.

Die AS-Sequenzen der AbbA-Proteine für folgende *Bacillus*-Arten wurden der NCBI Datenbank entnommen: FZB42 = *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42; CAU-B946 = *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CAU-B946; W23 = *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* W23; 168 = *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* 168; ATCC14580 = *Bacillus licheniformis* ATCC14580; SAFR-032 = *Bacillus pumilus* SAFR-032; 1942 = *Bacillus atrophaeus* 1942. Die AS-Sequenz von AbbA aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 wurde im Rahmen dieser Arbeit sequenziert (SMB, Berlin). Die pathogenen *Bacillus*-Spezies: A0248 = *Bacillus anthracis* A0248; CI = *Bacillus cereus* biovar. *anthracis* CI; F837/76 = *Bacillus cereus* F837/76; Al Hakam = *Bacillus thuringiensis* Al Hakam. Die abgeleitete Konsensus-Sequenz von AbbA verdeutlichte nochmals die Häufigkeit der auftretenden Aminosäuren innerhalb der unterschiedlichen *Bacillus*-Arten. Die rot-dargestellten Aminosäuren sind komplett konserviert (100% Ähnlichkeit), hoch konservierte AS-Reste mit einer Sequenzidentität von 100 % < AS > 75 % sind blau-dargestellt (92 % ein Lys, 83 % ein Thr, 75 % ein Ile), die mäßig konservierten AS-Reste von 66 % sind in grün und die mit einer Sequenzidentität von 58 % mit magenta hervorgehoben. Der Sequenzvergleich erfolgte mit ClustalW (DS Gene 1.5).

1.1.3 Zielgene von AbrB und AbrB-Bindungsstellen

Obwohl AbrB dafür bekannt ist, eine große Anzahl von verschiedensten DNA-Targets zu binden (Abbildung 1.3), scheint es dennoch eine Spezifität bei der DNA-Erkennung zu zeigen (Strauch *et al.* 1989b, Xu *et al.* 1996b). Die AbrB-Bindungsstellen (ABSs) weisen jedoch keine erkennbare Konsensus-Sequenz auf. Und obwohl das AbrB-Protein sowohl genetisch als auch biochemisch umfangreich untersucht wurde, ist es noch nicht gelungen aufzuklären, wie das AbrB und verwandte Proteine die ABSs erkennen, um die entsprechende Funktion auf der Genexpressionsebene zu erreichen (Chumsakul *et al.*

2011). Die AbrB-Bindungsstellen variieren in ihrer Größe, ihrer Position relativ zum Transkriptionsstartpunkt, der Anzahl der Bindungsstellen innerhalb eines Promotors und Gens und in der Distanz zwischen den ABSs (Abbildung 1.3). Die AbrB-Bindungsstellen, die in eine direkte Transkriptionsregulation involviert sind, sind generell in der *up*- und *downstream* Region der +1-Initiationsstelle des Target-Gens lokalisiert.

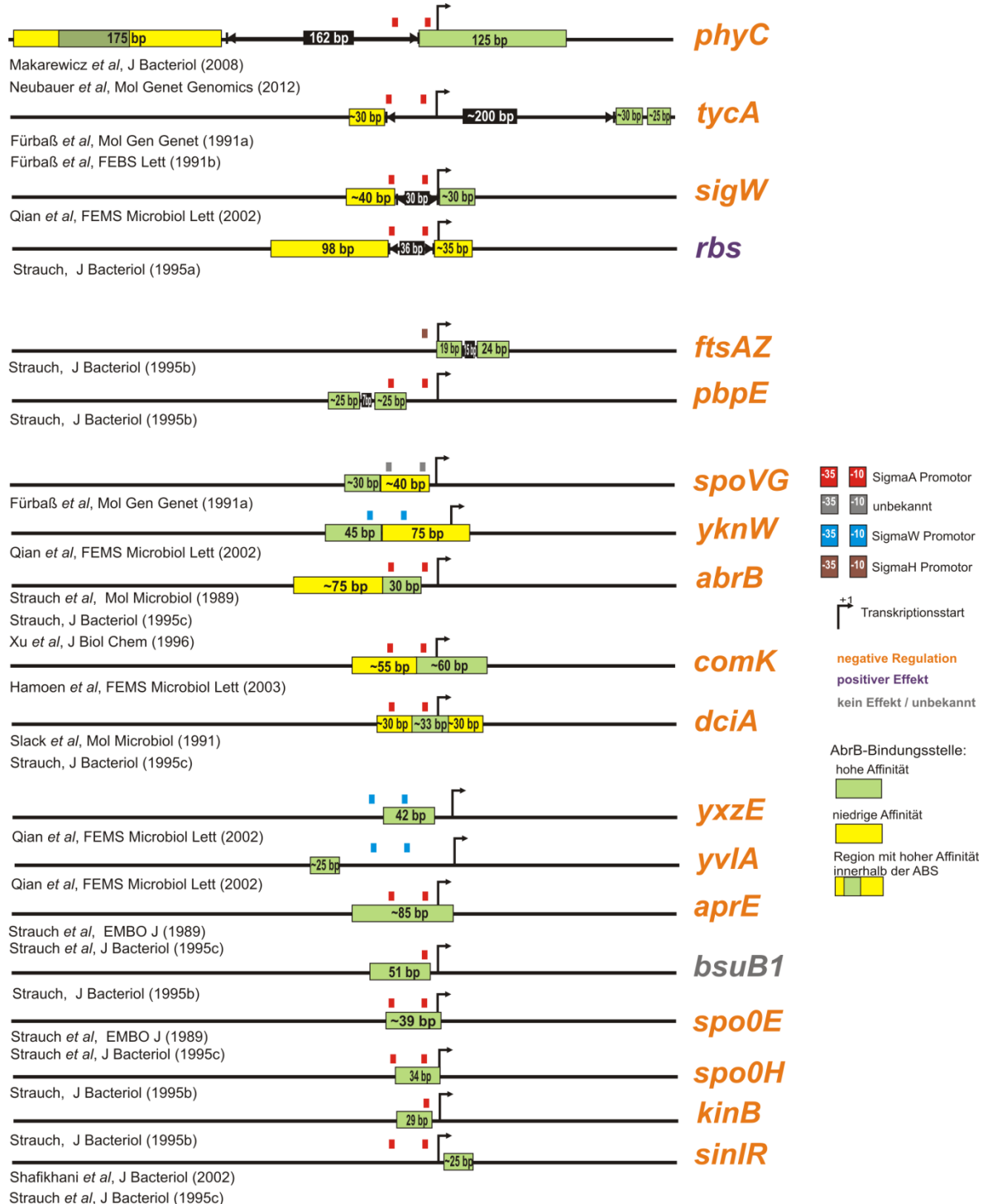


Abbildung 1.3: Vergleich von einigen bekannten AbrB-Bindungsstellen innerhalb der verschiedenen Promotorregionen mit dazu gehörigem Quellenverweis.

Die unterschiedlichen Affinitäten von AbrB zu AbrB-Bindungsstellen sind durch unterschiedliche Farben verdeutlicht. Die bp-Größe innerhalb der ABS-Box verdeutlicht den geschützten Bereich der analysierten DNA-Fragmente, die mithilfe von DNaseI-Footprinting abgeleitet wurden. Die roten Boxen zeigen σ^A - und die blauen Boxen die σ^W -abhängigen Promotorstrukturen (-10, -35). Bei den grauen Boxen ist der σ -Faktor unbekannt. Die unterschiedlich farbig markierten Gene verdeutlichen die negative (orange), positive (dunkelblau) und unbekannte (grau) Regulation, die von Bobay *et al.* (2004) tabellarisch zusammengefasst wurden.

Die meist bekannten chromosomal lokalisierten AbrB-Bindungsstellen liegen im Größenbereich zwischen 25 bp und 45 bp. Einige bekannte AbrB-Bindungsstellen (*rbs*, *yknW*, *abrB*, *comK*, *aprE* und *phyC*) weisen jedoch einen großen Bereich auf, der durch AbrB abgedeckt wird. Bestimmte DNA-Bereiche zeigen mehrere AbrB-Bindungsstellen innerhalb der Promotorregion, die in einem variablen Abstand voneinander entfernt liegen und unterschiedliche AbrB-Bindungsaffinitäten aufweisen. Dabei liegen die AbrB-Bindungsstellen von *ftsAZ*, *pbpE*, *sigW* und *rbs* mit einem Abstand von 7 bp bis 36 bp dicht beieinander, während die ABSs von *phyC* und *tyc4*-Gen mit einem Abstand von 100-200 bp eine starke Entfernung aufweisen. Bei einigen Genen, wie *abrB* und *yknW*, kommen die ABSs in Tandems vor, die unterschiedliche Affinität zum AbrB besitzen.

Aus den Bindungsanalysen einiger untersuchter Zielgene konnten die Dissoziationskonstanten (K_D) abgeleitet werden. Die Ergebnisse bekräftigten die Annahme, dass AbrB an seine Targets mit unterschiedlicher Affinität bindet (Strauch 1995c, Xu *et al.* 2001, Bobay *et al.* 2004). AbrB reguliert eine Vielzahl von Genen, deren simultane Expression während der vegetativen Wachstumsphase schädlich für die Zelle wäre. Die unterschiedlichen AbrB-DNA-Bindungsaffinitäten könnten somit für die Zelle ein wichtiger regulatorischer Faktor bei der zeitlich abgestimmten Freigabe der durch das AbrB reprimierten Gene beim Eintritt in die stationäre Phase sein (Bobay *et al.* 2004).

1.1.4 Nukleoid-assoziierte Proteine

Das meist ringförmige Genom von Bakterien wird als Nukleoid bezeichnet. Im Fall von *E. coli* wird die $4,6 \times 10^6$ bp lange DNA mit einer gestreckten Konturlänge von 1,6 mm um den Faktor ~ 1000 komprimiert, wodurch die DNA ein Viertel des Volumens der gesamten *E. coli*-Zelle (durchschnittliche Größe $0,75 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$) einnimmt (Dame 2005). Die Struktur eines Nukleoids ist extrem dynamisch. Sie besteht aus einem zentralen Kern mit mehreren hundert negativ superspiralisierten DNA-Loops, die topologisch unabhängige Domänen (etwa 10 kb Länge) bilden (Worcel *et al.* 1972, Higgins *et al.* 1996). Verantwortlich für die Struktur und die dynamische Funktion des Nukleoids sind Superspiralisierung, makromolekulares *crowding* und Nukleoid-assoziierte Proteine (NAPs) (Dame 2005).

Das Genom der Eukaryoten zeichnet sich im Gegensatz zu dem von Prokaryoten durch die sich in hohem Maße wiederholenden Sequenzen aus, wobei nur ein geringer Anteil davon proteinkodierend ist ($\sim 10\%$ des Genoms). Die meisten DNA-Abschnitte werden daher durch die Assoziation mit Histonen zu fest definierten, übergeordneten Chromatin-Fibrillen (Solenoiden) verpackt (Kornberg *et al.* 1981, Knippers 2001). Im dynamischen Chromatin der Bakterien wurden solche dicht verpackten, Solenoid-ähnlichen Strukturen nicht gefunden (Drlica *et al.* 1987). Die Nukleosom-ähnlichen Strukturen, deren Ausbildung durch kooperative Bindung der LrpC-NAPs an DNA, Protein-Protein-Interaktionen und anschließende DNA-Biegung (*wrapping*) induziert wird, konnten bei *B. subtilis* beobachtet werden (Beloin *et al.* 2003).

NAPs wurden früher oft als Histon-ähnliche Proteine bezeichnet. Da sie aber keine Sequenzähnlichkeiten zu den Histonen besitzen, wurde der Name „Nukleoid-assoziierte Proteine“ etabliert. Zwischen den Histonen und den NAPs besteht eine Ähnlichkeit in der niedrigen Molekülmasse (15,6 kDa H-NS aus *E. coli*; ~ 20 kDa Histon H1 der eukaryotischen Zelle), der überwiegend positiven Ladung des Proteins und vor allem in der Funktion, die in der Modulation der Chromatinstruktur liegt (Pul *et al.* 2007, Wolf *et al.* 2007). Die NAPs spielen innerhalb von Bakterien eine Schlüsselrolle bei der Anpassung an veränderte Umwelt- und Stressbedingungen. Sie sind strukturell oder regulatorisch an einer oder mehreren der DNA-abhängigen Funktionen wie Replikation, Rekombination oder Reparatur beteiligt. Außerdem tragen sie zur Kompaktierung der DNA bei. Die Änderungen der Umgebung haben einen direkten Einfluss auf die Affinität der NAPs zur DNA, so dass NAPs die DNA-Struktur lokal und abhängig von Wachstumsbedingungen modulieren, wodurch – direkt oder indirekt – die Transkription beeinflusst wird. So leisten die NAPs einen wichtigen Beitrag zur Regulation des Genexpressionsmusters von Bakterien (Dame 2005, Pul *et al.* 2007).

Am besten wurden die Eigenschaften der folgenden fünf NAPs aus *E. coli* untersucht: HU, H-NS, FIS, IHF und LRP. Die einzelnen Proteine haben unterschiedliche Einflüsse auf die DNA-Topologie (Abbildung 1.4) und können ihre Konzentration abhängig von der Wachstumsphase variieren (Talukder *et al.* 1999). Das IHF erreicht seine höchste Konzentration in der stationären Phase. Das FIS dominiert in der frühen exponentiellen Phase und nimmt dann rasch ab. AbrB wurde zum ersten Mal von O'Reilly *et al.* (1997) als ein Nukleoid-assoziiertes Protein betrachtet, vor allem, weil die Wachstumsphasen-abhängige *abrB*-Expression der von *fis* aus *E. coli* ähnlich ist. Die DNA-Zielbereiche der beiden Proteine, sowohl von AbrB als auch Fis, besitzen einen auffallend hohen AT-Gehalt. Weiterhin regulieren beide Proteine die Expression von zahlreichen Genen diverser Funktionen und werden negativ autoreguliert.

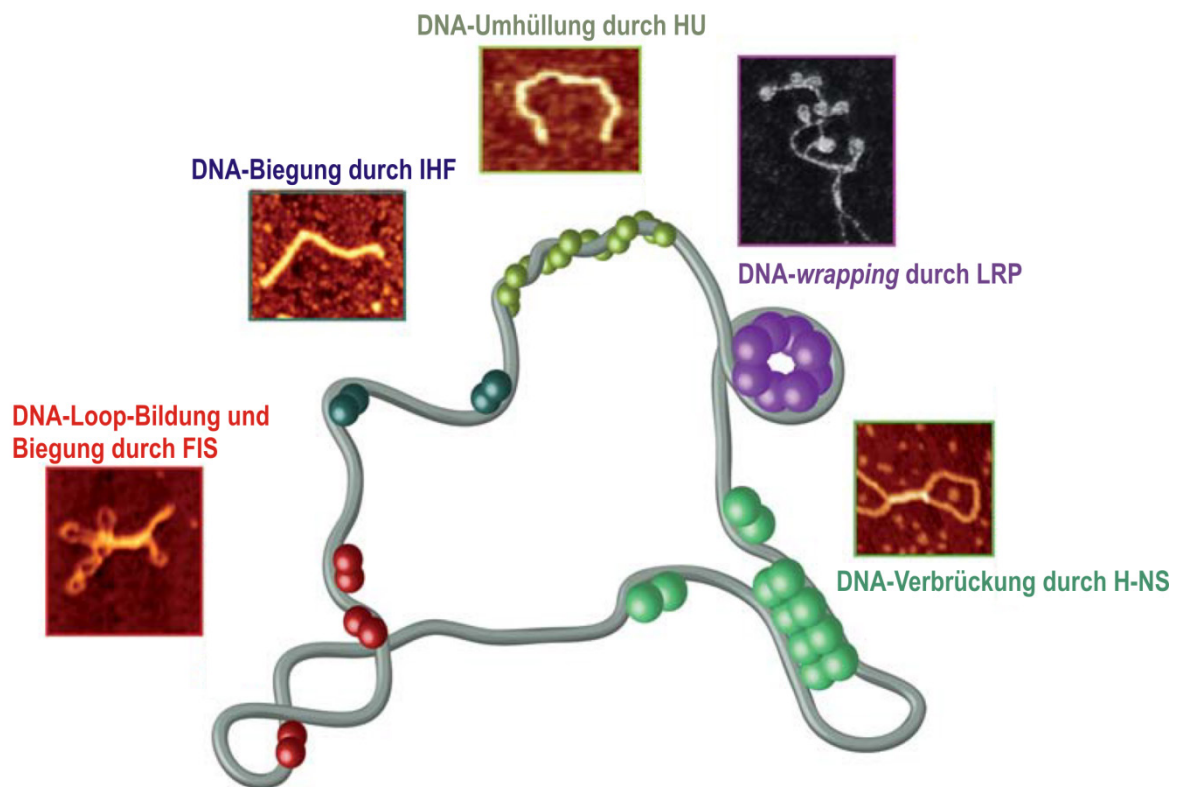


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung und AFM-Abbildungen der unterschiedlichen lokalen DNA-Strukturen, die durch einzelne NAPs moduliert werden.

Plektonemische (DNA um sich selbst gewickelt) Loops (FIS), DNA-Krümmung (IHF, HU), DNA-*wrapping* (LRP) und DNA-Verbrückung (H-NS). Die Abbildung wurde aus der Publikation von Pul & Wagner (Pul *et al.* 2007) übernommen.

1.2 Die Eigenschaften von AbrB

1.2.1 DNA-bindende Domäne - Struktur und Funktion

AbrB ist ein relativ kleines, tetrameres Protein, das aus identischen, 94 AS-Resten langen 10,5 kDa-Monomeren besteht. Ein AbrB-Monomer besteht aus zwei Domänen: I) Der N-terminalen DNA-Bindedomäne, die für die Dimerisierung und die DNA-Bindung verantwortlich ist (Vaughn *et al.* 2000, Yao *et al.* 2005); II) Der C-terminalen Domäne, über welche die Tetramerisierung realisiert wird. Die N-terminalen Domänen (AS-Reste von 1 bis 53 und 1 bis 55) zweier AbrB-Monomere formen eine stabile dimere DNA-Bindungstasche (Xu *et al.* 2001, Sullivan *et al.* 2008), die eine *swapped-hairpin* β -barrel-Struktur ($2 \times \beta\alpha\beta$) aufweist. Das β -Fass (β -barrel) entsteht, indem acht β -Stränge der homodimeren Domäne antiparallel und ineinander greifend verlaufen, und dabei die so genannten 'Haarnadeln' ausbilden (Bobay *et al.* 2005, Coles *et al.* 2005). Die Struktur der DNA-bindenden Domäne von AbrB ist deutlich anders als die von anderen bekannten DNA-bindenden Strukturen (Ishii *et al.* 2008). Das verkürzte AbrB, das nur die DNA-

bindenden Domänen umfasst (AbrBN), besitzt, so wie das *full-length* AbrB, die Fähigkeit die DNA *in vitro* zu erkennen, diese spezifisch zu binden und dabei stabile Protein-DNA-Komplexe zu formen (Benson *et al.* 2002, Bobay *et al.* 2004).

B. subtilis exprimiert zwei weitere paraloge Proteine, Abh und SpoVT, deren N-terminalen DNA-bindenden Domänen starke AS-Sequenzähnlichkeit zum AbrB besitzen (Chumsakul *et al.* 2011). Bei allen drei Proteinen weisen die jeweiligen DNA-Bindungsstellen ihrer Zielpromotoren keine Konsensus-ähnlichen Bindungsmotive auf. Im Gegensatz zu AbrB und Abh ist SpoVT kein Regulator der transienten Phase, sondern ein σ^G -abhängiger Transkriptionsfaktor der späten Sporulationsphase, der die Gen-Expression der Vorexpresse koordiniert (~ 47 Gene) (Dong *et al.* 2004). Die N-terminalen Domänen von Abh und AbrB sind hochkonserviert (Abbildung 1.5) und besitzen ungefähr 94 % Ähnlichkeit in der AS-Sequenz (70,4 % identische AS-Reste). Beide homomere Proteine, sowie ihre Heteromere, binden überlappende DNA-Targets (Chumsakul *et al.* 2011). AbrB und SpoVT binden an jeweils unterschiedliche DNA-Targets mit sehr hoher Spezifität (Asen *et al.* 2009), obwohl die AS-Sequenzähnlichkeit in den N-terminalen Domänen beider Proteine mit ~80 % (~60 % identische AS-Reste) recht hoch ist (Abbildung 7.4). Die DNA-bindende Domäne von AbrB kann *in vivo* die sehr ähnliche SpoVTN-Domäne allerdings nicht komplementieren (Dong *et al.* 2004). SpoVTN hat im Gegensatz zu AbrBN und AbhN weitere Argininreste R9, R27, R29, R40, die möglicherweise die unterschiedliche DNA-Spezifität bestimmen (Asen *et al.* 2009).

Obwohl die dreidimensionalen Strukturen der DNA-bindenden Domänen von AbrBN, AbhN und SpoVTN ähnlich sind, wurden dennoch feine Unterschiede identifiziert, die zu der Spezifität dieser drei paralogen Proteine bei der Bindung an die DNA-Targets beisteuern könnten (Bobay *et al.* 2006, Sullivan *et al.* 2008).

Basierend auf dem MazE-DNA-Komplex, der aus Mutationsanalysen abgeleitet wurde (Loris *et al.* 2003), und auf den strukturellen Ähnlichkeiten der DNA-bindenden Domänen von AbrB und MazE, wurde eine putative DNA-bindende Oberfläche für AbrB vorgeschlagen, die komplementär zu DNA in Form und Ladung ist. Diese Oberfläche umfasst die konservierten Arginin-Reste (R8, R15, R23 und R24), die auf gleicher Seite um das zentrale $\beta 2/\beta 2'$ -Faltblatt-Paar liegen (Bobay *et al.* 2005). Desweiteren wurde anhand der NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Studien der DNA-bindenden Domäne ein Bindungsmodell des AbrBN-Dimers mit der *abrB8*-Promotorregion verfeinert. Das vorgeschlagene Modell zeigte, dass strukturelle Flexibilität in den Loop-Regionen LP1, welche mit den Faltblatt-Strukturen $\beta 1$ und $\beta 2$ in Verbindung steht, und LP2, welche mit $\alpha 1$ und $\beta 3$ in Kontakt steht, vorliegt. Diese flexiblen Loop-Regionen könnten dem AbrB-Protein die Bindung an die verschiedenen DNA-Targets ermöglichen (Sullivan *et al.* 2008).

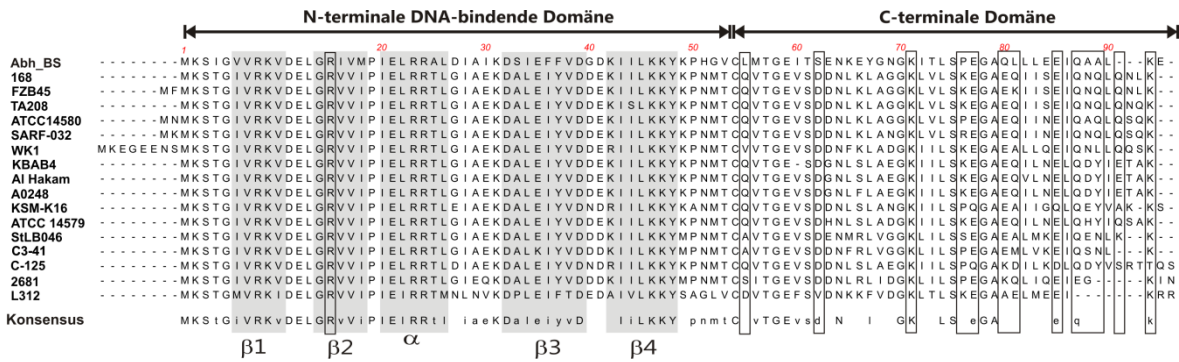


Abbildung 1.5: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von AbrB-ähnlichen Proteinen aus *Bacillus*-verwandten Arten.

Die Pfeile oberhalb der Sequenzen markieren die Lage der N- und C-terminalen Domänen. Die bekannten Sekundärstrukturen der DNA-bindenden Domänen (β -Faltblätter 1-4 und -Helix) sind mit einem hellgrauen Hintergrund dargestellt. Die AS-Sequenzen wurden der NCBI-Datenbank entnommen, der Sequenzvergleich erfolgte mit ClustalW. Die abgeleitete Konsensus-Sequenz unterhalb der AS-Sequenzen stellt die komplett konservierten Aminosäurereste (100 % Sequenzidentität) als Großbuchstabencode dar. Die hoch konservierten AS-Reste (Sequenzidentität > 80 %) sind durch einen Kleinbuchstabencode verdeutlicht. Die eingerahmten AS wurden im AbrB-Protein aus *Bacillus subtilis* im Rahmen dieser Arbeit substituiert. Abh_BS = Abh-Protein aus *B. subtilis* 168; 168 = *B. subtilis* 168; FZB45 = *B. amyloliquefaciens* FZB45; TA208 = *B. amyloliquefaciens* TA208; ATCC14580 = *B. lichineformis* ATCC14580; SARF-032 = *B. pumilus* SARF-032; WK1 = *Anoxybacillus flavithermus* WK1; KBAB4 = *B. weihenstephanensis* KBAB4; AlHakan = *B. thuringiensis* AlHakan; A0248 = *B. anthracis* A0248; KSM-K16 = *B. clausii* KSM-K16; ATCC14579 = *B. cereus* ATCC 14579; StLB046 = *Solibacillus silvestris* StLB046; C3-41 = *Lysinibacillus sphearicus* C3-41; C-125 = *B. halodurans* C-125; 2681 = *Sporosarcina newyorkensis* 2681; L312 = *Listeria monocytogenes* L312.

1.2.2 Die Superfamilie der AbrB-ähnlichen Transkriptionsfaktoren

Die ursprünglich publizierte NMR- Struktur von AbrBN, die als *looped-hinge helix* (Vaughn *et al.* 2000) dargestellt wurde, erwies sich als falsch (Coles *et al.* 2005). Die danach korrigierte Struktur der N-terminalen AbrB-Domäne (AbrBN) zeigte eine starke strukturelle Ähnlichkeit zu der großen Superfamilie von bekannten und putativen DNA-bindenden Proteinen, deren Faltung das *swapped-hairpin β -barrel*-Motiv besitzen (Bobay *et al.* 2005, Coles *et al.* 2005). Interessanterweise wurden anhand der strukturellen SCOP-Datenbank-Proteinanalysen zwei weitere AbrB-ähnliche Proteine, das MazE (beteiligt als MazE/MazF am programmierten Zelltod in *E. coli*) und das MraZ (beteiligt an der Regulation der Zellteilung in *E. coli* und *Mycoplasma pneumoniae*) gefunden. Denn alle drei Proteine weisen eine gemeinsame *swapped-hairpin β -barrel* Faltung auf (Bobay *et al.* 2005), die der *double- ψ barrels* Faltung der VatN-N-Domäne ähnelt. Die N-terminale Subdomäne der AAA ATPase Vat, die VatN-N, stellt die Substraterkennungs-Domäne im Archaeon *Thermoplasma acidophilum* dar. Aufgrund der Konservierung des $\beta\alpha\beta$ -Elementes wurde ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung für die *swapped-hairpin β -barrels* und die *double- ψ barrels* vorgeschlagen (Coles *et al.* 2005).

Die AbrB-Orthologen und –Paralogen, die ähnliche AS-Sequenzen der N-terminalen Domänen aufweisen, wurden in Genomen aller *Bacillus*-, *Clostridium*-, *Listeria*-Arten und der Proteobakterien gefunden (Abbildung 1.6). Die AbrB-Superfamilie umfasst zudem Proteine, die auf den bekannten Virulenzplasmiden aus allen pathogenen Organismen lokalisiert sind (Coles *et al.* 2005). Ein weiterer AbrB-ähnlicher Transkriptionsfaktor, C68, wurde auch in dem Archaeon, *Sulfolobus islandicus*, entdeckt (Contursi *et al.* 2011). Weiterhin wurden AbrB-ähnliche Proteine in Cyanobakterien identifiziert, wo sie mehrere physiologische und metabolische Prozesse regulieren, solche wie den Kohlenstoff- und Wasserstoffmetabolismus, oder die Stickstofffixierung und die Toxinproduktion (Ishii *et al.* 2008, Oliveira *et al.* 2008, Lieman-Hurwitz *et al.* 2009, Agervald *et al.* 2010).

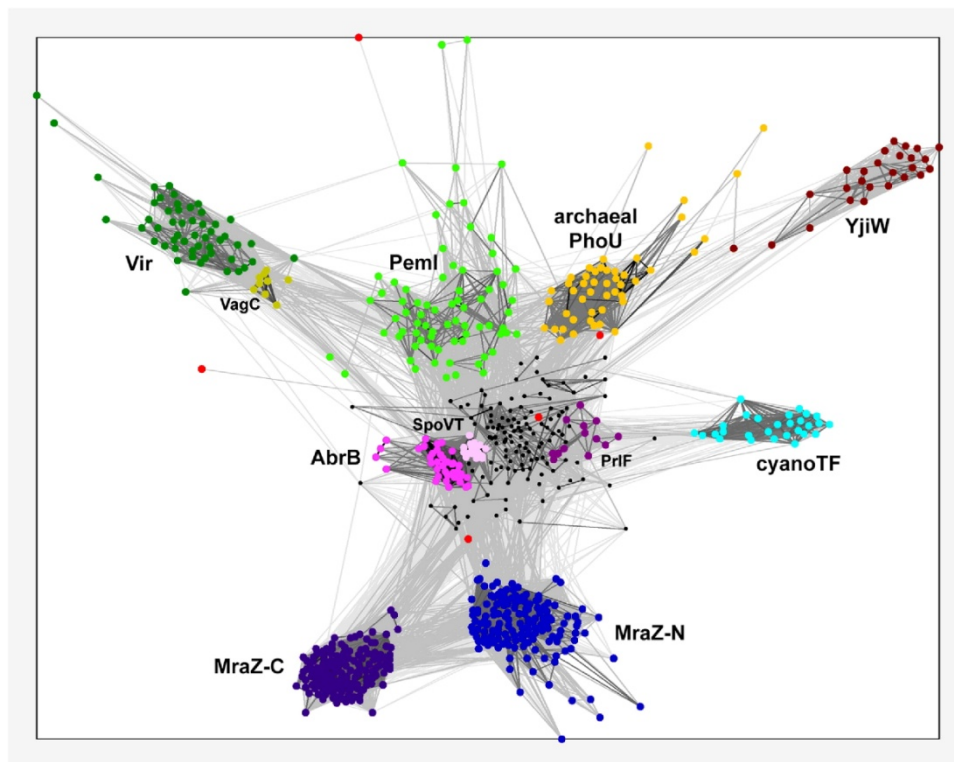


Abbildung 1.6: Cluster-Analyse der AbrB-Superfamilie.

Die Cluster-Analyse der 724 Sequenzen, die dem AbrB-Protein ähneln, erfolgte mit dem CLANS-Programm und lieferte acht Hauptclusters, die hier in unterschiedlichen Farben hervorgehoben sind. Die AbrB-Superfamilie umfasst Vertreter sämtlicher Bakterien- und Archaeen-Arten. Der zentrale AbrB-Kernbereich weist drei Unterbereiche von AbrB (*B. subtilis*), SpoVT (*B. subtilis*) und PrIF (PrIF/YhaV als Toxin-Antitoxin-System in Proteobakterien) auf. Der Vir-Bereich schließt die Proteine der Virulenzplasmide, darunter auch VagC aus *Salmonella* spp, ein. Die Toxin-Antitoxin-Systeme (*addiction modules*) enthalten die Antitoxine, wie PemI und MazE aus *E. coli*. Die PhoU-Gruppe umfasst die homologen Proteine aus Archaeen. Eine einzige MraZ-Polypeptidkette (Monomer), die zwei pseudo-symmetrische Hälften aufweist, formt eine β -barrel-Struktur. MraZ weist zwei Bereiche auf: N-Domäne-Gruppe ist irregulärer als die C-Domäne-Gruppe. Der YjiW-Bereich umfasst hypothetische Proteine aus Proteobakterien. Die Abbildung stammt von Coles *et al.* (2005).

1.2.3 Die C-terminale Domäne von AbrB-ähnlichen Proteinen

Während die Struktur der N-terminalen Domäne von AbrB aufgeklärt werden konnte (Coles *et al.* 2005, Sullivan *et al.* 2008), ist die Struktur des AbrB-Tetramers immer noch unbekannt. Es wird vermutet, dass die kurze C-terminale AbrB-Domäne eine weitgehend ungeordnete Struktur aufweist (Coles *et al.* 2005). Dass die C-terminale Domäne wichtig für die richtige Proteinfunktion ist, wurde durch Mutagenese-Experimente belegt (Xu *et al.* 1996a, Xu *et al.* 2001).

In Experimenten mit chimären Proteinen, bei denen die DNA-bindende Domäne des λ -cI-Repressorproteins an die C-terminalen Domänen von AbrB, Abh oder SpoVT fusioniert wurde, konnte gezeigt werden, dass die C-terminalen Domänen unabhängige Dimerisierungsmodule darstellen (Yao *et al.* 2005). Die unabhängige Dimerisierung über die C-Termini verlangt nach den Aminosäureresten ab dem C54-Rest (dem einzigen Cystein-Rest im Monomer), möglicherweise auch schon T53, bis einschließlich dem letzten K94. Somit sind für die Ausbildung des AbrB-Tetramers die Aktivitäten der beiden unabhängigen Dimerisierungsdomänen (N und C) nötig (Yao *et al.* 2005). Hier wäre auch zu erwähnen, dass eine Tetramerisierung durch den reduzierten Cysteinrest (C54) stabilisiert wird (Phillips *et al.* 2001, Yao *et al.* 2005).

Die C-terminalen Domänen der beiden AbrB-Paralogen, Abh und SpoVT, zeigen in den AS-Sequenzen stärkere Unterschiede zu AbrB. Die C-Termini von AbrB und Abh weisen nur 34 % identische AS-Reste auf (Abbildung 1.5). Der C-terminale Teil von SpoVT ist mit 124 Aminosäuren viel länger als das AbrBC mit seinen 41 Aminosäuren (C54 bis K94) (Yao *et al.* 2005, Asen *et al.* 2009). Durch weitere Experimente mit chimären Proteinen, die aus der Fusion der N-terminalen Domäne von AbrB mit den C-Termini von Abh bzw. SpoVT entstanden sind, kam man zur Annahme, dass die einzige Funktion der C-terminalen Domänen von AbrB-ähnlichen Proteinen in der Ausbildung eines aktiven, stabilen Tetramers bestehen müsste (Yao *et al.* 2005). Diese chimären Proteine zeigten *in vivo* die gleiche reprimierende Wirkung auf die *abrB8-lacZ*-Reporteraktivität wie das intakte WT-AbrB.

2009 ist es gelungen, die Kristallstruktur des gesamten SpoVT-Proteins aufzulösen. Diese zeigte eine ungewöhnliche Kombination aus einer *swapped-hairpin* β -barrel (N-Termini) und einer GAF-Domäne (C-Termini) (Asen *et al.* 2009). Somit besitzt das SpoVT eine große, gefaltete C-terminale Domäne, bestehend aus den fest definierten Sekundärstrukturelementen (α -Helices, β -Faltblattstrukturen und β -Turns). Zusätzlich zu ihrer Dimerisierungsfunktion (Yao *et al.* 2005) wurde der C-terminalen SpoVT-Domäne eine neue, regulatorische Funktion zugeschrieben (Asen *et al.* 2009). Die *in vivo* Tests zeigten, dass der C-Terminus für die SpoVT-Funktion entscheidend zu sein scheint (Dong

et al. 2004). Im Gegensatz zum AbrB, verliert das SpoVT allerdings seine Spezifität bei der *in vitro* DNA-Bindung, wenn die C-terminale Domäne deletiert wird (Dong *et al.* 2004). Bekannterweise verursacht die Bindung eines Liganden an die GAF-Domäne starke Konformationsänderungen. Beispielsweise wird der Regulator CodY durch die Bindung von GTP aktiviert und durch die Bindung von hydrophoben, verzweigten Aminosäuren inaktiviert. Von Asen *et al.* (2009) wurde vorgeschlagen, dass die Bindung eines Liganden an die GAF-Domäne die stabilisierenden Kontakte der asymmetrischen, inaktiven Form des SpoVT-Tetramers stört, und dadurch eine Neuordnung innerhalb der DNA-bindenden Domänen verursacht, was wiederum die Interaktion mit der DNA fördert.

1.3 Phytase – ein Zielgen von AbrB

1.3.1 Bedeutung von Phytasen

Phytasen sind in der Natur weit verbreitet, man findet sie bei Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen (Van Etten *et al.* 1991). Das Hauptinteresse an den Phytasen liegt in der Landwirtschaft und der Tierernährung, da sie Phosphate aus *myo*-Inositolhexakisphosphat (Phytinsäure) freisetzen. Die Phytinsäure ist in großen Mengen in Getreide und Leguminosen vorhanden, die zu den wichtigsten Nahrungsmitteln für Mensch und Tier gehören (Reddy *et al.* 1982, Lott *et al.* 2000). Monogastrische Tiere sind jedoch nicht in der Lage das Phosphat aus der Phytinsäure zu mobilisieren (Common 1989). Das Phytat (Anion der Phytinsäure) wird deswegen unverändert ausgeschieden. Dies bringt zwei Probleme mit sich: I) Phytat ist ein starker Chelatbildner und komplexiert sowohl bivalente Kationen als auch Aminosäuren (Reddy *et al.* 1982, Torres *et al.* 2005, Bohn *et al.* 2007, Maenz *et al.* 1999), was zu einem nährstoffentziehenden Effekt vor allem in der Tierhaltung und bei einer veganen Lebensweise führt (Mega 1982, Torre *et al.* 1991). II) Das in Böden angereicherte Phytat wird durch Mikroorganismen verdaut, wodurch die Böden und das Grundwasser mit Phosphaten verunreinigt werden (Pen *et al.* 1993, Yanke *et al.* 1998).

Phytasen bilden eine sehr heterogene Gruppe und sind unter den einzelnen Arten nicht verwandt. Die Phytasen werden nach der Art der hydrolytischen Spaltung, der pH-Optima und der Struktur kategorisiert (Einteilung nach dem Nomenklaturkomitee IUPAC-IUBMB). Zu den 3-Phytasen gehören hauptsächlich die Pilz- und bakteriellen Phytasen. Diese werden bei Pilzen, wie *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficcum* (Shieh *et al.* 1968, Ullah *et al.* 1987) und bei grampositiven Bakterien, wie *Bacillus* (Kerovuo *et al.* 1998) als extrazelluläre Enzyme sekretiert. Die Phytasen der gramnegativen Bakterien, wie *E. coli* (Greiner *et al.* 1993), *Citrobacter* (Kim *et al.* 2003), *Klebsiella* (Sajidan *et al.* 2004) sind periplasmatische Enzyme und werden als 6-Phytasen bezeichnet.

Die β -Propeller-Phytasen, die bei *Bacillus* vorkommen, bilden innerhalb der 3-Phytasen eine eigenständige Gruppe, die keine Ähnlichkeiten bezüglich der Struktur und biochemischer Eigenschaften zu anderen Phytasen aufweisen (Kim *et al.* 1998, Kerovuo *et al.* 2000). Die β -Propeller-Phytasen sind Ca^{2+} -abhängig, thermostabil und hydrolysieren Phytat im neutralen bis alkalischen Milieu bis zum *myo*-Inositoltriphosphat (Shin *et al.* 2001, Oh *et al.* 2006, Greiner *et al.* 2007).

1.3.2 Regulation von *phyC* in *Bacilli*

In verschiedenen Studien, die dieser Arbeit vorangingen (Makarewicz 2006, Makarewicz *et al.* 2008), wurde für die Regulationsuntersuchungen des Phytasepromotors aus *Bacillus*-Arten das funktionelle und gut exprimierte *phyC*-(Phytase)-Gen aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 verwendet (Idriss *et al.* 2002). Dabei konnte gezeigt werden, dass Phytase zum Pho-Regulon gehört und damit zur Versorgung der *Bacillus*-Zellen mit alternativen Phosphat-Quellen bei Phosphatmangel beiträgt (Makarewicz *et al.* 2006).

1.3.2.1 *phyC*-Promotor von *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45

Bacillus subtilis und seine Verwandten verfügen über eine Vielzahl von σ -Faktoren, die je nach Umweltbedingungen, Wachstums- und Differenzierungsphase exprimiert werden und jeweils spezifisch bestimmte Promotorsequenzen erkennen. Während der normalen exponentiellen Vermehrung ist der Standard-Sigmafaktor σ^A für die Transkription der Gene des allgemeinen Stoffwechsels (*housekeeping genes*) verantwortlich (Knippers 2001, Schlegel 2007). Seine Erkennungssequenz (TTGACA-17 \pm 1_{bp}-TATAAT) ist identisch mit der von σ^{70} aus *E. coli* (Knippers 2001). Das *phyC*-Gen besitzt eine untypische σ^A -abhängige Promotorstruktur. Die -10-Region mit der Sequenz TACAAT (-7 bis -12) und die -35-Region TTAACA (-34 bis -39) sind durch ein Fenster von 21 bp (Konsensus 16 bis 18 bp) von einander getrennt und liegen damit um ca. 113° zueinander gedreht (Makarewicz *et al.* 2006, Neubauer 2008). Der Transkriptionsstart von *phyC* ist ein G und befindet sich 27 Basenpaare vom Translationsstart entfernt (Makarewicz *et al.* 2006).

Innerhalb der *phyC*-Promotorregion wurde ein PhoP-Tandemmotiv identifiziert, das *upstream* und innerhalb der -35-Region (Position -50 bis -34) lokalisiert ist, und ein einziges PhoP-Motiv, das die -10-Region um eine Base überlagert (Abbildung 1.7) (Makarewicz *et al.* 2006). Eine *cre*-(*catabolite response element*)-ähnliche Sequenz konnte 167 bp vor dem *phyC*-Transkriptionsstart ebenfalls identifiziert werden (Neubauer 2008). Weiterhin wurden zwei große AbrB-Bindungsstellen gefunden (Abbildung 1.3). Die AbrB-Bindungsstelle 1, ABS1, ist 175 bp groß und befindet sich *upstream* des *phyC*-Promotors

in einem Bereich von -354 bis -180 (relativ zum *phyC*-Transkriptionsstartpunkt). Die AbrB-Bindungsstelle 2, ABS 2, ist 125 bp groß und liegt in dem Bereich von -18 bis +107. Die ABS2 überlappt somit die -10-Region, den Transkriptionsstartpunkt und reicht in die kodierende *phyC*-Region hinein (Makarewicz *et al.* 2008).

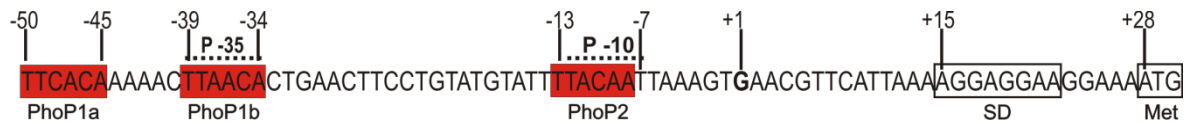


Abbildung 1.7: Promotorstruktur des *phyC*-Gens von FZB45.

Die PhoP-Boxen sind rot eingrahmt: das Tandempaar aus zwei PhoP-Boxen (PhoP1a und PhoP1b) und ein einziges PhoP-Motiv PhoP2. Die Promotorstrukturen (P-10 und P-35) sind oberhalb der PhoP-Boxen mit punktierten Linien verdeutlicht. Die Abbildung ist nach Makarewicz *et al.* (2006) modifiziert dargestellt.

1.3.2.2 Regulatorproteine von *phyC*_{FZB45}

Die Expression eines Proteins wird bei Prokaryoten auf unterschiedlichen Ebenen reguliert: transkriptionell (Aktivierung/Repression der Initiation; Antitermination), posttranskriptionell (z.B. *gene silencing* durch siRNAs) und translationell (z.B. Attenuation). Das *phyC*-Gen aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 unterliegt einer komplexen Kontrolle durch drei verschiedene Regulatoren und wird auf den folgenden Ebenen reguliert:

I. Das *phyC*-Gen gehört zum Pho-Regulon und wird über die Aktivierung des Zwei-Komponenten-Systems PhoPR unter Phosphatmangel dual reguliert. Das System wird durch die Autophosphorylierung der membrangebundenen His-Kinase PhoR unter Phosphatmangel aktiviert, anschließend wird die Phosphatgruppe an den Responseregulator PhoP übertragen. In dieser Form kann PhoP~P die Expression von bis zu 31 Genen aktivieren, die den Abbau alternativer Phosphatquellen aus organischen Verbindungen bewerkstelligen (Hulett *et al.* 1994, Makarewicz *et al.* 2006). Das *pho*-Operon wird durch PhoP~P selbst aktiviert und durch Spo0A~P indirekt gehemmt, indem es die Expression zweier Aktivatoren, ResD und AbrB, unterdrückt. Die Bindung des dimeren PhoP~P an die -35-Region ist essentiell für die Aktivierung des *phyC*-Promotors. Allerdings ist der positive Effekt konzentrationsabhängig, bei höheren PhoP~P-Konzentrationen sinkt die Transkriptionseffizienz auf einen konstanten Spiegel. Dieser Effekt wird durch die PhoP~P-Bindung an die -10-Region vermittelt (Makarewicz *et al.* 2006).

II. Die negative Regulation des *phyC*-Gens wird durch den globalen Regulator der transienten Phase, das AbrB, bewerkstelligt. Somit verhindert AbrB eine auf Phosphatmangel passende Antwort während des vegetativen Wachstums. Dabei bindet AbrB an zwei ausgedehnte, 162 bp voneinander entfernte AbrB-Bindungsstellen in der

phyC-Promotorregion und verhindert dadurch sterisch die Bindung des RNAP-PhoP~P-Komplexes. Für die Hemmung von *phyC* durch AbrB ist die Anwesenheit der beiden Bindungsstellen erforderlich (Makarewicz *et al.* 2008). Andererseits ist AbrB ein positiver Regulator des *phoPR*-Operons. AbrB sichert somit die Zelle mit einer ausreichenden Menge an PhoPR noch vor dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase ab. Dieser Fall ermöglicht, dass der aktivierte Responseregulator PhoP~P sofort wirken kann, wenn die Wachstumsrate aufgrund des Phosphatmangels reduziert ist und die AbrB-Expression durch Spo0A~P gehemmt wird (Makarewicz *et al.* 2008).

III. Einen positiven Effekt auf die *phyC*-Expression hat CcpA (Makarewicz 2006), das für die globale Kontrolle des Kohlenstoffmetabolismus bei *B. subtilis* zuständig ist. Das am Ser46-Rest phosphorylierte Hpr-Protein, das Bestandteil des Phosphotransferasesystems ist, fungiert als positiver Effektor von CcpA (Deutscher *et al.* 1995, Ramstrom *et al.* 2003). Der aktivierte Hpr~P-(Ser46)-CcpA-Komplex bindet an die Erkennungssequenz *cre* (*catabolite response element*) und vermittelt entweder die Kohlenstoffkatabolit-Repression (CCR) oder die Kohlenstoffkatabolit–Aktivierung (CCA), abhängig von der Lokalisierung des *cre* (Miwa *et al.* 2000, Fujita *et al.* 2007). Die Bindung von CcpA an die *cre*-ähnliche Sequenz *upstream* des *phyC*-Promotors hatte keinen direkten Effekt auf die *phyC*-Transkription. Allerdings gab es einen Hinweis auf eine posttranskriptionelle Regulation von *phyC*, denn CcpA zeigte eine starke Bindung an das mRNA-Transkript (Neubauer 2008, Tsyglakova 2010). Diese Eigenschaft von CcpA wurde bislang für keines der Gene beschrieben, die unter der Kontrolle von CcpA stehen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In den vorangegangenen Arbeiten (Makarewicz 2006, Makarewicz *et al.* 2008, Neubauer 2008) konnte bereits gezeigt werden, dass der AbrB-Bindung an die *phyC*-Promotorregion ein komplexer Mechanismus zur Grunde liegen muss. In der vorliegenden Arbeit sollten mittels der SPR-(*Surface Plasmon Resonance*)-Methode die Bindungskinetiken zwischen dem AbrB bzw. AbrBN und den AbrB-Bindungsstellen der *phyC*-Promotorregion analysiert und daraus K_D -Werte und Hill-Koeffizienten abgeleitet werden. Zusätzlich sollten mittels der Zirkulardichroismus-Spektroskopie die Konformationsänderungen innerhalb des Proteins bzw. der DNA untersucht werden. Mittels chemischer Interferenz-Footprints sollten die Basen innerhalb der *phyC*-ABSs identifiziert werden, die im direkten Kontakt mit AbrB stehen.

Die C-terminalen Domänen wurden bislang nur sehr mangelhaft untersucht. Um die Rolle der C-Termini bei der DNA-bindenden Aktivität zu prüfen, wurden diese einer gezielten Mutationsanalyse unterzogen. Die Auswirkung der Aminosäure-Substitutionen

auf die Tetramerisierung des AbrB-Proteins sollte mittels Gelfiltration untersucht werden. Der Effekt auf die Bindungsaktivität sollte an zwei unterschiedlichen Targets, *phyC* und *sinIR*, mittels Gelretardationsanalyse erfolgen.

Ferner sollte die Wirkung und der Bindungsmechanismus des AbrB-Antirepressors analysiert werden. Dabei stellt sich die Frage, ob AbbA mit AbrB allosterisch oder als Kompetitor der DNA interagiert. Daher war es von großem Interesse, die Wechselwirkungen zwischen AbrB und AbbA sowie den Einfluss von AbbA auf die *phyC*-Expression zu untersuchen. Mittels Gelretardationsanalysen in nativer Agarose-Gelelektrophorese sollten eine konzentrationsabhängige Komplexbildung und die Stöchiometrie analysiert werden. Mittels der SPR-Methode sollte die Bindung von AbbA an AbrB kinetisch untersucht werden. Die Kompetitionsstudien mit DNA und AbbA sollten mittels Gelretardationsanalyse und Zirkulardichroismus-Spektroskopie erfolgen.

Ferner war auch die Strukturaufklärung beider Proteine im Fokus. Besonders war die Aufklärung der bislang unbekannten Struktur des gesamten AbrB-Proteins vom Interesse.

2 Ergebnisse und Auswertungen

2.1 SPR-(*Surface Plasmon Resonance*)–Bindungsstudien

2.1.1 Vorbereitung der AbrB-Sensorchips

Die AbrB-Proteine (Liganden) wurden an die Dextranmatrix des CM5-Sensorchips (Biacore Life Sciences, GE Healthcare) über die Aminogruppen des Liganden kovalent gekoppelt (Kapitel 5.3.6.3).

Die Sensorsignale werden in *Response Units* (RU) angegeben, die der an den Chip gebundenen Masse direkt proportional sind. Da die molekularen Massen der Analyten (ds-DNA-Oligonukleotide ca. 24,45 kDa, AbbA BS 9,77 kDa bzw. AbbA BA 9,84 kDa) und die Qualitäten der Sensorgramme unterschiedlich waren, wurden verschieden beladene AbrB-Sensorchips für die kinetischen Experimente mit den ds-DNA-Oligonukleotiden und den AbbA-Proteinen generiert, um möglichst gute Signalstärken zu erhalten.

Ferner wurde in Vorexperimenten die Stabilität und die Regenerierbarkeit der Sensorchips geprüft und optimiert (Methode, Kapitel 5.3.6.4). Die AbrB-Sensoroberfläche lieferte bei bis zu hundert Einzelmessungen stabile Bindungssignale. Da jedoch die Gesamtmenge an Bindungs- und Regenerierungszyklen wesentlich höher war, wurden die Flusszellen nach jeweils hundert Einzelexperimenten durch eine Injektion von 30 µl einer 0,5 µM Proteinlösung bei einer Flussrate von 10 µl/min rekonstituiert, um die Polymerformen zu regenerieren (Anhang, Abbildung 7.12 C).

2.1.1.1 AbrB-Sensorchips für Kinetiken mit ds-DNA-Oligonukleotiden

In einigen Vorexperimenten wurde AbrB mit unterschiedlichen Dichten an den CM5-Sensorchip (226, 540, 1020 und 8000 RU) gebunden. Anschließend erfolgte eine Bindungsreaktion mit dem U3-Oligonukleotid bei einer Flussrate von 50 µl/min. Das Sensorsignal stieg entsprechend linear an (Anhang, Abbildung 7.12 A). Da jedoch bei den niedrigen AbrB-Dichten die Sensorgramme starkes Rauschen aufwiesen, wurden für Messungen der Bindungskinetik die AbrB-Proteine mit relativ hohen Dichten an die Chipoberfläche immobilisiert: 8679 RU von AbrB BS (0,16 pmol/mm², AbrB-Tetramer) an Flusszelle 4 (Fc4), 6638 RU von AbrBN (0,39 pmol/mm², AbrBN-Dimer) an Fc3 und 3289 RU von Lysozym (0,23 pmol/mm²) an Fc2. Die Flusszelle Fc1 wurde als unbeladene Referenzzelle verwendet.

Das AbrB und sein verkürztes N-terminales Derivat AbrBN weisen einen hohen isoelektrischen Punkt (IEP von 8,3 bei AbrB und IEP von 9,3 bei AbrBN) auf. Um ausschließen zu können, dass Sensorsignale durch die unspezifischen elektrostatischen

Interaktionen der negativ geladenen DNA mit dem positiv geladenen Protein zustande kommen, wurde das Lysozym, das einen IEP>10 aufweist, als eine unspezifische Proteinkontrolle (Fc2) verwendet. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in den Messsignalen (Fc2), im Vergleich zur Referenzzelle (Fc1, nur Puffer) registriert werden (Anhang, Abbildung 7.12 B), weshalb davon auszugehen war, dass nur spezifische Interaktionen zu messbaren Signalen führten.

2.1.1.2 AbrB-Sensorchips für Kinetiken mit AbbA

Bei der Immobilisierung der AbrB-Proteine für die Bindungskinetiken mit dem AbbA wurde die molekulare Masse und die polymere Form der Proteine berücksichtigt und die auf den Sensorchip zu immobilisierende Liganden-Menge RU_{Ligand} nach der Gleichung (1) berechnet (Ritzefeld *et al.* 2012):

$$RU_{Ligand} = \frac{RU_{max} * M_{Ligand} * V_{Ligand}}{M_{Analyt}} = \frac{100 \text{ RU} * 12,64 \text{ kDa} * 4}{9,77 \text{ kDa}} = 517,5 \text{ RU} \quad (1)$$

Die aufgeführte Rechnung (1) zeigt am Beispiel von AbrB BS (Ligand) und AbbA BS (Analyt), wie viele RU von AbrB in der Flusszelle theoretisch zu beladen sind, um eine Signalstärke von 100 RU zu erreichen, unter der Annahme, dass die Proteine miteinander 1:1 (AbrB-Tetramer:AbbA) interagieren. M_{Ligand} entspricht dabei der molekularen Masse von AbrB BS (12, 64 kDa), V_{Ligand} stellt die polymere Form von AbrB BS (Tetramer) dar und M_{Analyt} ist die molekulare Masse von AbbA BS (9,77 kDa). Dementsprechend wurden die zu immobilisierenden Mengen von AbrB BA (513,8 RU) und AbrBN (173,6 RU) berechnet und die vergleichbaren Mengen an Protein beladen: 470 RU von AbrB BA (9,29 fmol/mm², AbrB-Tetramer) an die Flußzelle 4 (Fc4), 484 RU von AbrB BS (9,57 fmol/mm², AbrB-Tetramer) an Fc3 und 143,6 RU von AbrBN (8,49 fmol/mm², AbrBN-Dimer) an Fc2. Die Flusszelle 1 (Fc1) diente als unbeladene Referenzzelle.

2.1.2 Bindungsparameter der Interaktion von ds-Oligonukleotiden mit AbrB und AbrBN

2.1.2.1 Bindungskinetik der Oligonukleotide mit AbrB und AbrBN

Zur Ermittlung der kinetischen und der thermodynamischen Merkmale, die die Bindungsreaktionen zwischen dem AbrB und der ABS1 bzw. ABS2 beschreiben, wurden die 13 ds-DNA-Oligonukleotide verwendet, die 40 Basenpaare (mit Ausnahme von U8 mit 32 bp und D5 mit 46 bp; Tabelle 4.9) groß waren und alle zusammen die beiden AbrB-Bindungsstellen der *phyC*-Promotorregion aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 abdeckten.

Jedes Oligonukleotid überlappte mit dem benachbarten Oligonukleotid um 20 Basenpaare (Abbildung 2.1). Um das Bindungsmodell zu vereinfachen, wurden die relativ kurzen DNA-Fragmente als Analyten und die AbrB-Proteine als Liganden verwendet.

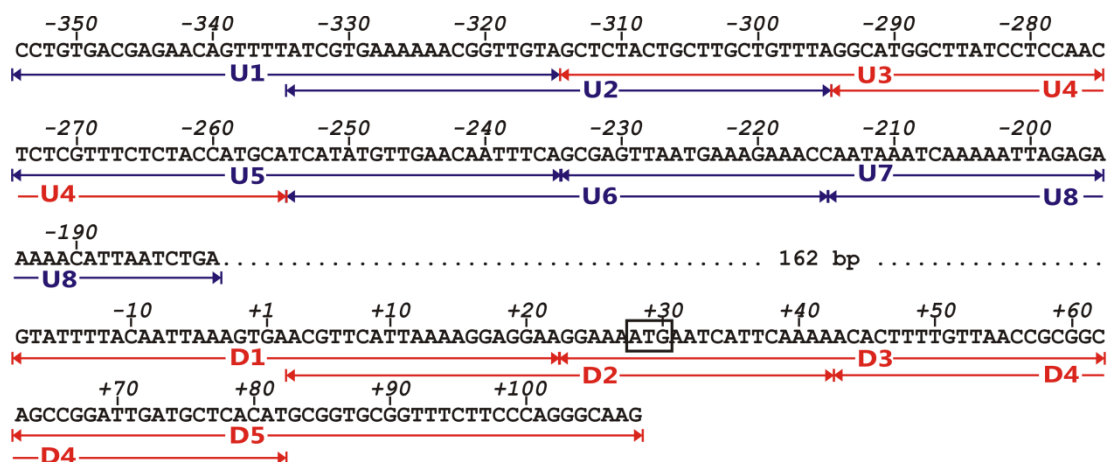


Abbildung 2.1: *phyC*-Promotorregion aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 mit den dargestellten ds-DNA-Oligonukleotiden.

Die beiden AbrB-Bindungsstellen sind durch einen Bereich von 162 bp voneinander getrennt. Die Oligonukleotide U1 bis U8 präsentieren die *upstream* lokalisierte ABS1. D1 bis D5 präsentieren ABS2, die den Transkriptionsstart und das ATG-Startkodon umfasst. Die Fragmente überlappen um 20 bp. Die Einteilung der ds-DNA-Oligonukleotide in Gruppe I (rot) und Gruppe II (blau) erfolgte aufgrund der Bindungskinetik der SPR-Sensorgramme.

Die Oligonukleotide wurden in den Konzentrationen von 5 nM bis 100 nM durch die Flusszellen appliziert (Methode, Kapitel 5.3.6.4) und die Bindungskinetiken in Echtzeit gemessen (Abbildung 7.12 D). Die resultierenden SPR-Sensorgramme der einzelnen Oligonukleotide wurden jeweils in einem Diagramm, entsprechend der Interaktion mit dem *full-length* AbrB bzw. verkürzten AbrBN-Protein zusammen gefasst (Abbildung 2.2). Die SPR-Signalstärken (*Response Units* - RU) stiegen konzentrationsabhängig bei allen ds-Oligonukleotiden während der Assoziationsphase an.

Bereits durch die Betrachtung der Sensorgramme wurde ersichtlich, dass die Bindungseigenschaften der einzelnen Oligonukleotide in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Zur genaueren Analyse wurden die RU_{max} -Werte ermittelt. RU_{max} einer Reaktion tritt bei maximaler Analytenkonzentration auf, wenn der Ligand (AbrB) vollständig mit Analyt gesättigt ist. Der RU_{max} -Wert wurde direkt aus den nicht-linearen *steady-state fits* (Kapitel 2.1.2.2) abgeleitet. Die Gruppe I (GI) zeigte hohe RU_{max} -Werte bei der Bindung mit AbrB und niedrige RU_{max} -Werte bei der Bindung mit AbrBN (Abbildung 2.2 A). Bei der Bindung der GI-Oligonukleotide mit AbrB wurde bis zu einer Konzentration von über 60 nM keine Dissoziation beobachtet. Erst bei höheren Konzentrationen konnte eine langsame Dissoziation festgestellt werden. Zur Gruppe I gehörten die Oligonukleotide U3 und U4 aus ABS1 und alle ABS2-Oligonukleotide (D1 bis D5). Die Sensorgramme der

Gruppe II (GII) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen AbrB und seinem N-terminalen Derivat AbrBN (Abbildung 2.2 B). Gruppe II umfasste die meisten DNA-Fragmente aus der ABS1 (U1, U2, U5, U6, U7, U8). Bei der Bindung mit AbrBN zeigten alle Oligonukleotide (GI und GII) vergleichbare Sensorgramme mit beobachteten RU-Werten von unter 250 RU bei höchster Analytkonzentration. Das Balkendiagramm (Abbildung 2.3) verdeutlicht die Unterschiede zwischen den RU_{max} -Werten bei der Bindung der GI- und GII-Oligonukleotide mit AbrB und AbrBN.

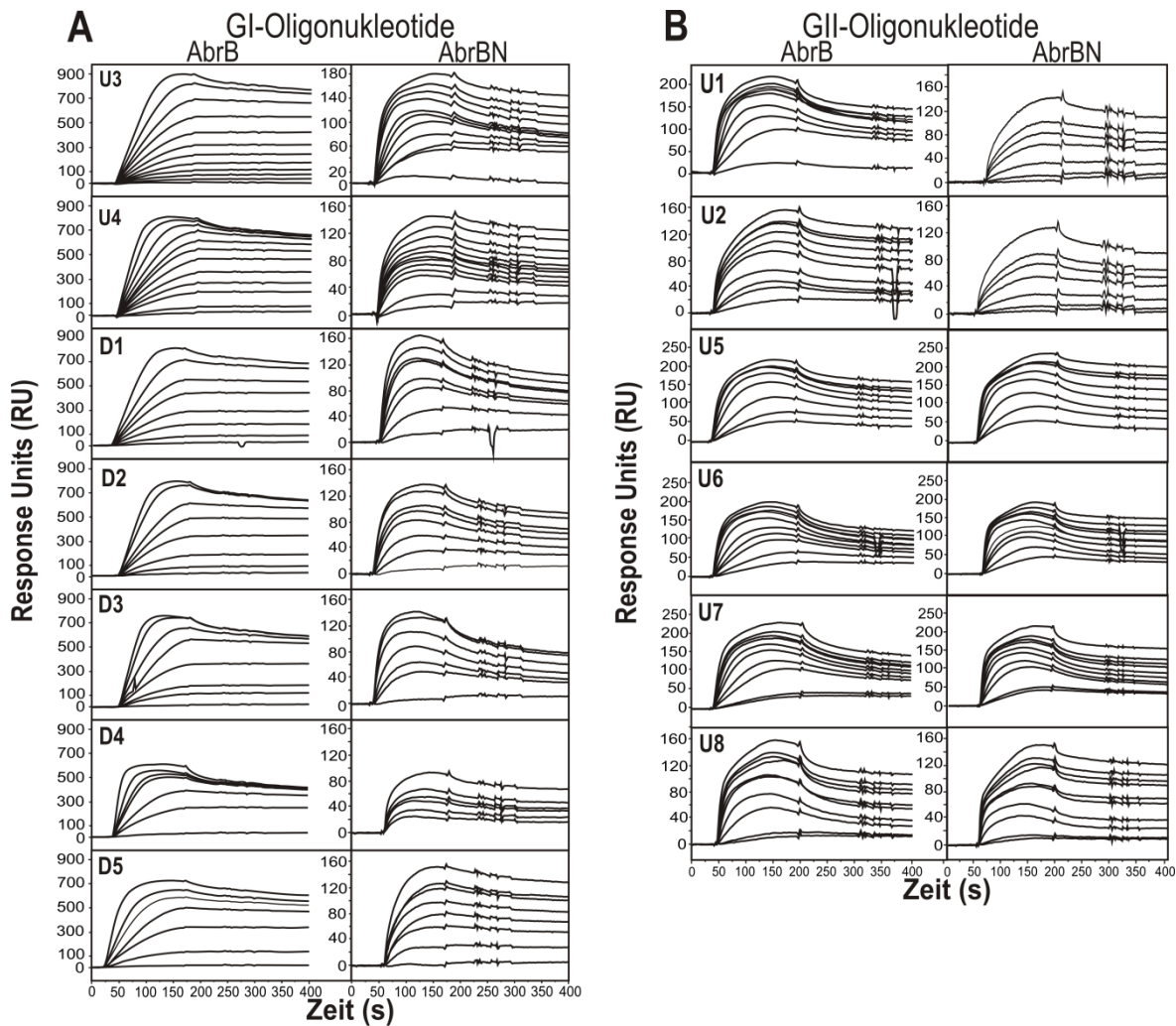


Abbildung 2.2: SPR-Sensorgramme der Interaktionen zwischen den AbrB-Proteinen und den ds-DNA-Oligonukleotiden.

(A) Bindungsreaktionen zwischen den GI-Oligonukleotiden (U3, U4 aus ABS1 und allen D-Oligonukleotiden aus ABS2) und dem *full-length* AbrB (links) bzw. dem AbrBN (rechts). (B) Bindungsreaktionen zwischen den GII-Oligonukleotiden (U1 bis U2, U5 bis U8 aus ABS1) und dem *full-length* AbrB (links) bzw. dem AbrBN (rechts). Das Messsignal wurde als *Response Units* (Bindungseinheiten in RU) über die Zeit in Sekunden dargestellt. Die unterschiedlichen Konzentrationen von ds-DNA-Oligonukleotiden (5-100 nM) wurden über den Sensorchip geschickt. Die SPR-Kurven wurden nach dem Protokoll von Software BIAevaluation 3.1 normalisiert (Entfernung der Regenerierungsphase, Y-Transformierte, *zero baseline*).

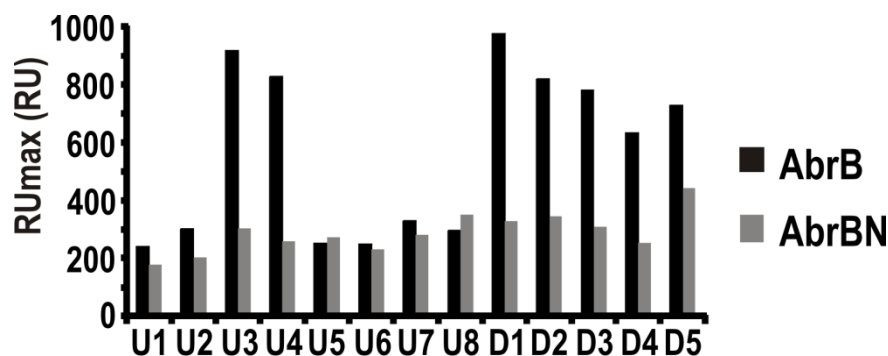


Abbildung 2.3: Balkendiagramm der RU_{max}-Werte (RU) bei der Bindung der GI- und GII-Oligonukleotide mit AbrB (schwarz) bzw. AbrBN (grau).

RU_{max} einer Reaktion tritt bei maximaler Analytenkonzentration auf, wenn der Ligand (AbrB) vollständig mit Analyt gesättigt ist. Der RU_{max}-Wert wurde aus den *general fitting*-Modellen abgeleitet. Alle RU_{max}-Werte sind in der Tabelle 2.1 zusammengefasst.

2.1.2.2 Auswertung der Dissoziationskonstanten aus den SPR-Daten

Sowohl die Assoziations-, als auch die Dissoziationsphasen der Kurvendiagramme für die jeweiligen Oligonukleotide konnten nicht simultan (*global fit*) ausgewertet werden. Demzufolge wurden die thermodynamischen Parameter unter den Gleichgewichtsbedingungen der Bindungen ausgewertet. Um eine thermodynamische Anpassung (*fit*) durchführen zu können, wurden die im Gleichgewichtsbereich (*steady-state*) der Assoziationsphase abgelesenen RU-Einheiten (R_{eq}) als eine Funktion der entsprechenden Analytenkonzentrationen aufgetragen und die daraus resultierenden Kurven mit den unterschiedlichen *general fitting*-Modellen mittels der Software BIAevaluation 3.1 ausgewertet. Bei der Bindung zeigten die GII-Oligonukleotide sowohl mit dem AbrB als auch mit dem AbrBN einen hyperbolischen Kurvenverlauf (Abbildung 2.4 A, B) und lieferten die beste Anpassung unter Nutzung der Gleichung *steady-state affinity* (Kapitel 5.3.6.5, Gleichung (2)). Die sigmoiden Bindungskurven wurden bei den GI-Oligonukleotiden mit dem *full-length* AbrB (Abbildung 2.4 A, C) beobachtet, die mit der 4-*parameter-equation* (Kapitel 5.3.6.5, Gleichung (3)) ausgewertet wurden. Die GI-Oligonukleotide zeigten bei der Interaktion mit dem AbrBN, ähnlich wie die GII-Oligonukleotide, ebenfalls einen hyperbolischen Kurvenverlauf. Das χ^2 (Chi-Quadrat) diene als Qualitätsmerkmal der errechneten Parameter beim Anpassen der Kurven (Abbildung 5.5). Die Auswertung mit *steady-state affinity* lieferte direkt die thermodynamischen K_D-Werte. K_D ist ein Mass für die Affinität des Rezeptors und stellt den RU_{max}/2-Wert dar, welcher die Oligonukleotidkonzentration angibt, bei der die Hälfte aller Bindungsstellen des AbrB-Liganden besetzt ist. Die Anpassung mit 4-*parameter-equation* lieferte zwei Konstanten A₁ und A₂, dabei entsprach A₁ der Dissoziationskonstante K_D.

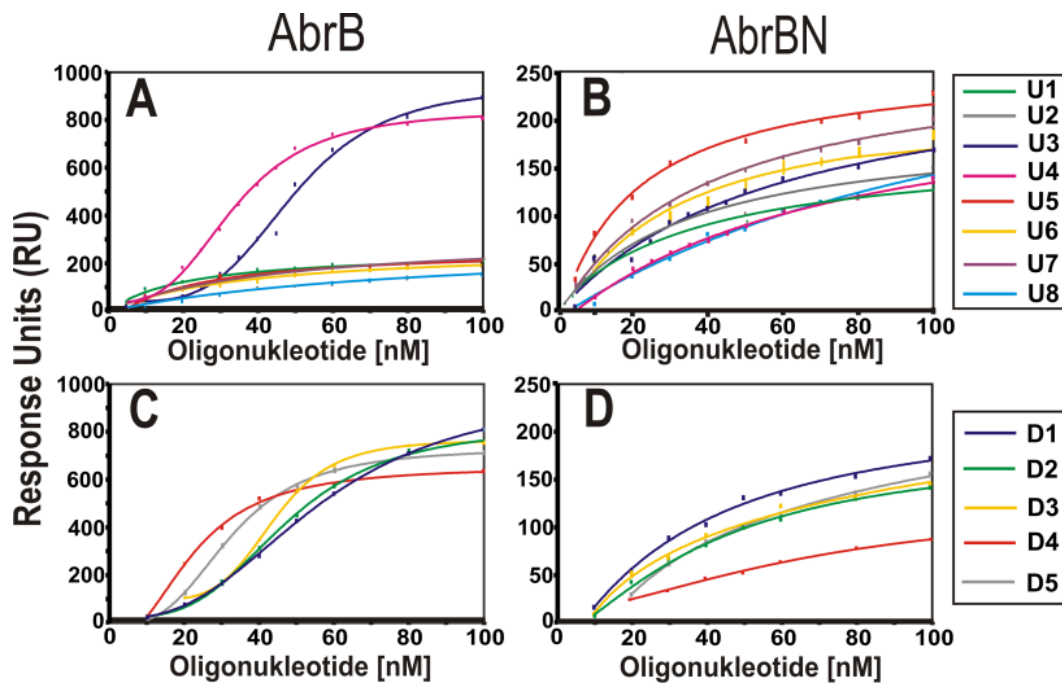


Abbildung 2.4: Plots der Response Units (RU) aus dem *steady-state* –Bereich der Assoziationsphase (R_{eq}) gegen die Oligonukleotidkonzentrationen [nM].

Der Kurvenverlauf der Bindungsreaktionen der ABS1-Oligonukleotide mit AbrB (A) und AbrBN (B). ABS2-Oligonukleotide in Interaktion mit dem AbrB (C) und AbrBN (D).

Die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation konnte auch aus dem Hill-Plot (Abbildung 7.13, Anhang und Kapitel 5.3.6.5 Gleichung (4)) abgeleitet werden. Bei der doppelt-logarithmischen Hill-Auftragung von $\log[R_{eq}/(RU_{max}-R_{eq})]$ gegen $\log[Oligos]$ lieferte der Abszissenabschnitt die Dissoziationskonstante K_{Hill} . Die Dissoziationskonstante K_{Hill} stellt in dem Fall auch einen $RU_{max}/2$ -Wert dar. Die Dissoziationskonstanten (K_D und K_{Hill}) sind in der Abbildung 2.5 (A, B) graphisch dargestellt. Die beobachteten Werte aus den beiden Methoden (*general fitting*-Modell und Hill-Plot) variierten nicht stark bei der Bindung der Oligonukleotide mit *full-length* AbrB (Tabelle 2.1). Diese lagen im Bereich zwischen $16,4 \times 10^{-9}$ M (K_D U1) und $87,7 \times 10^{-9}$ M (K_D U8) oder $15,7 \times 10^{-9}$ M (K_{Hill} U1) und $71,4 \times 10^{-9}$ M (K_{Hill} U8). Bei der Bindung an AbrBN lagen die Dissoziationskonstanten der GI-Oligonukleotide zwischen $66,1 \times 10^{-9}$ M (K_D U3) und 238×10^{-9} M (K_D D4) und die der GII-Oligonukleotide lagen bei $19,1 \times 10^{-9}$ M (K_{Hill} U5) bis 133×10^{-9} M (K_D U8). Die Affinität der GI-Oligonukleotide zum AbrBN-Dimer schien im Gegensatz zum AbrB somit etwas niedriger zu sein. Die GII-Oligonukleotide wiesen keine signifikanten Unterschiede bei der Bindung an beide Proteine auf. Dennoch waren die beobachteten Dissoziationen bei allen gemessenen Sensorgrammen sehr langsam, was die Stabilität der DNA-Protein-Komplexe beider AbrB-Formen über die Zeit zum Ausdruck bringt. Die resultierenden K_{Hill} - bzw. K_D -Werte, sowie die RU_{max} -Werte und Hill-Koeffizienten für alle ds-Oligonukleotide sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

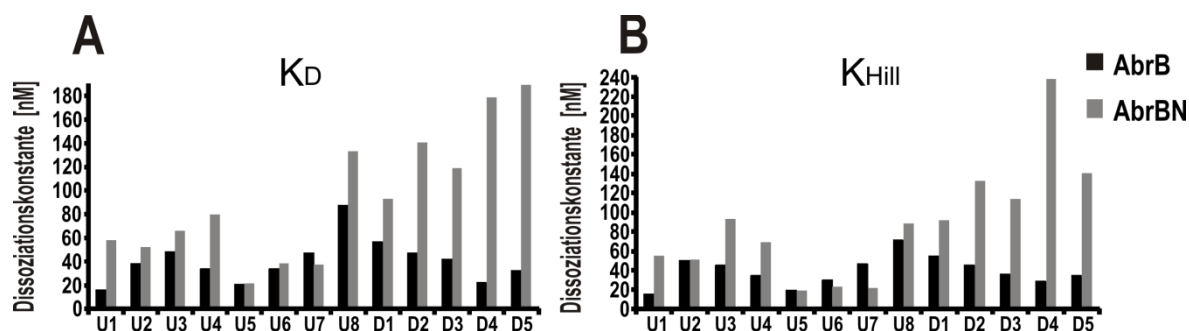


Abbildung 2.5: Die aus den Gleichgewichtsbindungsdaten ermittelten Dissoziationskonstanten.

(A) Die Dissoziationskonstanten (K_D) wurden direkt mit den *steady-state fitting* Modellen (*steady state affinity* und *4-parameter equation*) berechnet. (B) Der Abszissenabschnitt der linearen Hill-Auftragung lieferte K_{Hill} .

Tabelle 2.1: Resultierende Parameter (K_D , K_{Hill} , RU_{max} , n_{Hill}) für alle ds-DNA-Oligonukleotide sowohl mit *full-length* AbrB als auch mit AbrBN.

Die Dissoziationskonstanten K_D mit Einheit [M] und RU_{max} -Werte wurden direkt aus nicht-linearen *steady-state fits* (*steady state affinity* und *4-parameter equation*) abgeleitet (Gleichung (2) und (3)), Kapitel 5.3.6.5). Die Steigung (m) der linearen Funktion der Hill-Plots lieferte die Hill-Koeffizienten (n_{Hill}). Der X-Achsenabschnitt der Hill-Auftragung stellte die Dissoziationskonstanten K_{Hill} für alle ds-DNA-Oligonukleotide dar.

AbrB					AbrBN				
		K _D (M)	RU _{max}	K _{Hill} (M)	n _{Hill}	K _D (M)	RU _{max}	K _{Hill} (M)	n _{Hill}
GI	U3	48,5 x 10 ⁻⁹	919	45,3 x 10 ⁻⁹	2,37	66,1 x 10 ⁻⁹	304	93,6 x 10 ⁻⁹	1,00
	U4	33,8 x 10 ⁻⁹	828	34,4 x 10 ⁻⁹	2,07	79,8 x 10 ⁻⁹	258	69,5 x 10 ⁻⁹	1,06
	D1	56,8 x 10 ⁻⁹	977	55,1 x 10 ⁻⁹	2,38	93,2 x 10 ⁻⁹	329	92,5 x 10 ⁻⁹	1,02
	D2	47,5 x 10 ⁻⁹	820	45,2 x 10 ⁻⁹	2,78	141 x 10 ⁻⁹	344	132 x 10 ⁻⁹	1,07
	D3	42,4 x 10 ⁻⁹	782	36,0 x 10 ⁻⁹	3,58	119 x 10 ⁻⁹	308	114 x 10 ⁻⁹	0,95
	D4	22,5x 10 ⁻⁹	632	28,6 x 10 ⁻⁹	2,52	179 x 10 ⁻⁹	255	238 x 10 ⁻⁹	0,74
	D5	32,4 x 10 ⁻⁹	730	34,5 x 10 ⁻⁹	2,99	189 x 10 ⁻⁹	444	141 x 10 ⁻⁹	1,28
GII	U1	16,4 x 10 ⁻⁹	242	15,7 x 10 ⁻⁹	1,08	58,2 x10 ⁻⁹	176	55,6 x 10 ⁻⁹	1,09
	U2	38,8 x 10 ⁻⁹	302	50,5 x 10 ⁻⁹	1,05	52,6 x 10 ⁻⁹	201	51,2 x 10 ⁻⁹	1,15
	U5	21 x 10 ⁻⁹	251	19,5 x 10 ⁻⁹	1,03	21,9 x 10 ⁻⁹	274	19,1 x 10 ⁻⁹	0,96
	U6	34,1 x 10 ⁻⁹	250	30,2 x 10 ⁻⁹	1,02	38,2 x 10 ⁻⁹	231	23,3 x 10 ⁻⁹	1,01
	U7	47,5 x 10 ⁻⁹	329	46,7 x 10 ⁻⁹	1,06	37,5 x 10 ⁻⁹	281	22,2 x 10 ⁻⁹	1,16
	U8	87,7x 10 ⁻⁹	296	71,4 x 10 ⁻⁹	1,15	133 x 10 ⁻⁹	349	88,4 x 10 ⁻⁹	1,17

2.1.2.3 Auswertung der kinetischen Parameter

Die Bindungsreaktionen werden durch kinetische Parameter beschrieben, die zusätzliche Informationen zum Bindungsmodell liefern können. Zur Berechnung der Parameter wurden sowohl Injektionsstart und -stopp, als auch die Bereiche der Assoziation und Dissoziation, über die eine Berechnung erfolgen soll, festgelegt. Den einzelnen Kurven wurde deren Analytenkonzentration zugeordnet, das Bindungsmodell ausgewählt und die Berechnung gestartet. Da die simultane Anpassung (mehrere Kurven

- *global fit*) des Sensorgramms nicht zufriedenstellend war, wurde jede Bindungskurve unter Anwendung des *Two-State-Reaction*-Modells separat (*local fit*) analysiert. Das *Two-State-Reaction* -Modell lieferte vier kinetische Parameter, k_{a1} , k_{d1} , k_{a2} und k_{d2} (Tabelle 2.2) zu allen Oligonukleotiden, die das Modell $A+B \leftrightarrow [AB] \leftrightarrow A_xB$ beschreiben (Kapitel 5.3.6.5). Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_{a1} und Dissoziation k_{d1} beschreiben die Kinetik der Bindungsreaktion $A+B \leftrightarrow [AB]$, wobei der k_{a1} -Wert die Geschwindigkeit der Komplexbildung darstellt, bei der eine bestimmte Anzahl der AbrB-DNA-Komplexe pro Sekunde in einer molaren Lösung [$M^{-1} s^{-1}$] aus AbrB-Proteinen und Oligonukleotiden gebildet wird. Der k_{d1} -Wert beschreibt dabei die Stabilität des AbrB-DNA-Komplexes $[AB]$ und gibt den Zerfall der Komplexe pro Sekunde [s^{-1}] an (Zerfallsgeschwindigkeit). Die Geschwindigkeitskonstanten k_{a2} und k_{d2} präsentieren die Konformationsänderungen $[AB] \leftrightarrow A_xB$.

Die k_{a1} -Werte für die Bindung mit AbrB lagen im Bereich zwischen $2,78 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ (D1) und $8,72 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ (U1) und für AbrBN zwischen $5,91 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ (U1) und $1,88 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ (D5). Die Bindung mit AbrB lieferte k_{d1} -Werte zwischen $9,60 \times 10^{-4} s^{-1}$ (U3) und $2,94 \times 10^{-2} s^{-1}$ (U8) und mit AbrBN zwischen $9,55 \times 10^{-3} s^{-1}$ (D3) und $1,50 \times 10^{-2} s^{-1}$ (U7). Beim Vergleich der Werte für k_{d1} , k_{a2} und k_{d2} wurde ersichtlich, dass die k_{d2} -Geschwindigkeitskonstanten viel niedriger als die k_{a2} - und k_{d1} -Werte waren. Um die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (GI, GII) bei der Bindung an AbrB bzw. zwischen den beiden Proteinen zu verdeutlichen, wurden die Quotienten k_{d1}/k_{a2} und k_{a2}/k_{d2} gebildet und in einem Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 2.6). Aus den k_{d1}/k_{a2} -Quotienten (Abbildung 2.6 A) wurde deutlich, dass die Bindung der GI-Oligonukleotide mit AbrB das Gleichgewicht der *Two-State-Reaction* in Richtung A_xB verschiebt. Ferner, zeigten die k_{a2}/k_{d2} -Quotienten (Abbildung 2.6 B), dass bei der Bindung an AbrB die GI-Oligonukleotide das Gleichgewicht der Konformationsänderungen in Vorwärtsrichtung wesentlich schneller verschieben (Quotienten > 10) als die GII-Oligonukleotide (hier stellte U5 mit einem hohen k_{a2}/k_{d2} -Quotienten eine Ausnahme dar). Bei der Bindung an AbrBN lagen bei fast allen Oligonukleotiden (mit Ausnahme von U2) die Werte der k_{a2}/k_{d2} -Quotienten sehr niedrig.

Tabelle 2.2: Ermittlung der kinetischen Parameter unter Anwendung des *Two-State-Reaction* -Modells.

Die Auswertung (*fit*) jeder Kurve erfolgte separat (*local fit*). Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_{a1} und Dissoziation k_{d1} stehen für die Kinetik der Bindungsreaktionen, während die Geschwindigkeitskonstanten k_{a2} und k_{d2} konformationelle Änderung präsentieren, wobei k_{a2} mit der Einheit [s^{-1}] unabhängig von der Molarität ist. Die Affinitätskonstante K_D wurde aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten nach der Gleichung wie folgt abgeleitet: $K_D = (k_{d1}/k_{a1}) * (k_{d2}/k_{a2})$. Neben jedem Wert wurde in Klammern die Standardabweichung angegeben.

AbrB	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} (1/s)	k_{a2} (1/s)	k_{d2} (1/s)	K_D (M)
U1	$8,72 (\pm 2,25) \times 10^5$	$1,08 (\pm 0,52) \times 10^{-2}$	$6,32 (\pm 2,32) \times 10^{-3}$	$1,63 (\pm 2,31) \times 10^{-4}$	$3,20 \times 10^{-10}$
U2	$7,05 (\pm 2,78) \times 10^5$	$1,60 (\pm 0,99) \times 10^{-2}$	$1,22 (\pm 0,58) \times 10^{-2}$	$3,81 (\pm 3,30) \times 10^{-4}$	$7,10 \times 10^{-10}$
U3	$4,04 (\pm 1,89) \times 10^5$	$9,60 (\pm 6,75) \times 10^{-4}$	$6,58 (\pm 23,3) \times 10^{-3}$	$2,18 (\pm 3,10) \times 10^{-5}$	$7,87 \times 10^{-12}$
U4	$4,21 (\pm 1,97) \times 10^5$	$2,22 (\pm 1,73) \times 10^{-3}$	$7,31 (\pm 4,98) \times 10^{-3}$	$1,18 (\pm 0,98) \times 10^{-5}$	$8,51 \times 10^{-12}$
U5	$6,40 (\pm 2,08) \times 10^5$	$8,95 (\pm 3,08) \times 10^{-3}$	$5,91 (\pm 2,76) \times 10^{-3}$	$9,81 (\pm 7,40) \times 10^{-6}$	$2,32 \times 10^{-11}$
U6	$6,37 (\pm 0,56) \times 10^5$	$1,45 (\pm 0,45) \times 10^{-2}$	$6,45 (\pm 1,39) \times 10^{-3}$	$1,30 (\pm 2,58) \times 10^{-4}$	$4,59 \times 10^{-10}$
U7	$6,17 (\pm 0,75) \times 10^5$	$1,29 (\pm 0,71) \times 10^{-2}$	$5,76 (\pm 2,58) \times 10^{-3}$	$1,52 (\pm 3,43) \times 10^{-4}$	$5,53 \times 10^{-10}$
U8	$7,52 (\pm 1,81) \times 10^5$	$2,94 (\pm 1,17) \times 10^{-2}$	$9,25 (\pm 3,57) \times 10^{-3}$	$4,15 (\pm 3,51) \times 10^{-4}$	$1,75 \times 10^{-9}$
D1	$2,78 (\pm 1,27) \times 10^5$	$2,78 (\pm 2,38) \times 10^{-3}$	$1,14 (\pm 0,24) \times 10^{-2}$	$8,17 (\pm 4,09) \times 10^{-6}$	$6,13 \times 10^{-12}$
D2	$3,39 (\pm 1,23) \times 10^5$	$3,00 (\pm 2,68) \times 10^{-3}$	$1,51 (\pm 0,64) \times 10^{-2}$	$1,68 (\pm 1,81) \times 10^{-4}$	$9,81 \times 10^{-11}$
D3	$3,78 (\pm 1,24) \times 10^5$	$2,67 (\pm 2,48) \times 10^{-3}$	$8,33 (\pm 5,15) \times 10^{-3}$	$2,71 (\pm 2,85) \times 10^{-5}$	$2,30 \times 10^{-11}$
D4	$8,69 (\pm 1,61) \times 10^5$	$4,97 (\pm 3,69) \times 10^{-3}$	$6,77 (\pm 3,43) \times 10^{-3}$	$6,30 (\pm 7,60) \times 10^{-5}$	$5,32 \times 10^{-11}$
D5	$5,64 (\pm 1,21) \times 10^5$	$3,73 (\pm 1,22) \times 10^{-3}$	$1,14 (\pm 0,31) \times 10^{-2}$	$2,35 (\pm 4,09) \times 10^{-5}$	$1,36 \times 10^{-11}$
AbrBN	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} (1/s)	k_{a2} (1/s)	k_{d2} (1/s)	K_D (M)
U1	$5,91 (\pm 1,29) \times 10^5$	$4,76 (\pm 2,75) \times 10^{-3}$	$4,47 (\pm 0,18) \times 10^{-3}$	$6,32 (\pm 10,04) \times 10^{-5}$	$1,14 \times 10^{-10}$
U2	$8,45 (\pm 1,92) \times 10^5$	$8,35 (\pm 4,58) \times 10^{-3}$	$5,79 (\pm 2,28) \times 10^{-3}$	$2,53 (\pm 2,30) \times 10^{-5}$	$3,35 \times 10^{-11}$
U3	$1,53 (\pm 0,22) \times 10^6$	$9,40 (\pm 8,37) \times 10^{-3}$	$1,10 (\pm 0,82) \times 10^{-2}$	$4,81 (\pm 7,08) \times 10^{-4}$	$2,69 \times 10^{-10}$
U4	$1,83 (\pm 0,89) \times 10^6$	$2,82 (\pm 5,05) \times 10^{-2}$	$2,66 (\pm 3,92) \times 10^{-2}$	$1,57 (\pm 1,11) \times 10^{-3}$	$9,08 \times 10^{-10}$
U5	$1,29 (\pm 0,51) \times 10^6$	$1,58 (\pm 1,71) \times 10^{-2}$	$1,13 (\pm 0,67) \times 10^{-2}$	$2,07 (\pm 2,61) \times 10^{-4}$	$2,24 \times 10^{-10}$
U6	$1,18 (\pm 0,29) \times 10^6$	$9,20 (\pm 4,41) \times 10^{-3}$	$6,86 (\pm 2,64) \times 10^{-3}$	$6,01 (\pm 13,4) \times 10^{-5}$	$6,85 \times 10^{-11}$
U7	$1,11 (\pm 0,20) \times 10^6$	$1,50 (\pm 0,89) \times 10^{-2}$	$7,34 (\pm 4,40) \times 10^{-3}$	$1,87 (\pm 2,89) \times 10^{-4}$	$3,44 \times 10^{-10}$
U8	$1,54 (\pm 0,57) \times 10^6$	$4,60 (\pm 3,78) \times 10^{-2}$	$2,44 (\pm 17,8) \times 10^{-3}$	$7,55 (\pm 3,15) \times 10^{-4}$	$9,26 \times 10^{-10}$
D1	$1,25 (\pm 0,24) \times 10^6$	$7,24 (\pm 1,25) \times 10^{-3}$	$6,06 (\pm 0,61) \times 10^{-3}$	$3,66 (\pm 5,98) \times 10^{-4}$	$3,48 \times 10^{-10}$
D2	$1,33 (\pm 0,31) \times 10^6$	$8,48 (\pm 2,54) \times 10^{-3}$	$7,28 (\pm 3,01) \times 10^{-3}$	$3,19 (\pm 6,80) \times 10^{-4}$	$2,79 \times 10^{-10}$
D3	$1,45 (\pm 0,35) \times 10^6$	$9,55 (\pm 2,60) \times 10^{-3}$	$5,51 (\pm 1,68) \times 10^{-3}$	$2,53 (\pm 4,84) \times 10^{-4}$	$3,01 \times 10^{-10}$
D4	$1,67 (\pm 0,73) \times 10^6$	$1,39 (\pm 1,57) \times 10^{-2}$	$1,21 (\pm 0,76) \times 10^{-2}$	$1,08 (\pm 1,08) \times 10^{-3}$	$7,47 \times 10^{-10}$
D5	$1,88 (\pm 0,61) \times 10^6$	$1,60 (\pm 1,65) \times 10^{-2}$	$1,25 (\pm 0,83) \times 10^{-2}$	$7,12 (\pm 9,95) \times 10^{-4}$	$4,84 \times 10^{-10}$

Die Dissoziationskonstanten K_D konnten auch direkt aus den Geschwindigkeitskonstanten, unter Berücksichtigung aller vier Parameter, berechnet werden (Kapitel 5.3.6.5, Gleichung (9); Tabelle 2.2). Diese K_D -Werte stellten die Dissoziationskonstanten der gesamten Reaktion der *Two-State-Reaction* dar. Eine Varianz wurde sowohl zwischen den zwei Oligonukleotid-Gruppen als auch zwischen den beiden Proteinen festgestellt. Bei der Bindung an AbrB wurde der Unterschied zwischen den zwei Oligonukleotid-Gruppen deutlich. Die niedrigsten K_D -Werte lagen im pM-Bereich und zeigten U3 mit $7,87 \times 10^{-12}$ M, U4 mit $8,51 \times 10^{-12}$ M und D1 mit $6,13 \times 10^{-12}$ M. Die restlichen GI-Oligonukleotide zeigten ebenfalls niedrige K_D -Werte, die im Bereich zwischen $9,81 \times 10^{-11}$ M und $1,36 \times 10^{-11}$ M lagen. Die GII-Oligonukleotide (U1, U2, U6-U8) wiesen höhere K_D -Werte auf. Das Oligonukleotid U5, das laut den oben aufgeführten Ergebnissen (Kapitel 2.1.2.1) der Gruppe II zugeordnet wurde, stellte hier eine Ausnahme dar. Die niedrigen K_D -Werte der Gruppe I wiesen eine höhere Affinität der GI-Oligonukleotide zu AbrB im Vergleich zur Gruppe II auf. Die K_D -Werte bei der Bindung mit AbrBN lagen im gleichen Potenzbereich ($9,26 \times 10^{-10}$ bei U8 M und $2,24 \times 10^{-10}$ M bei U5) mit Ausnahme von U2 mit $3,35 \times 10^{-11}$ M und U6 mit $6,85 \times 10^{-11}$ M. Somit zeigten fast alle Oligonukleotide bei der Bindung mit AbrBN ähnliche K_D -Werte und damit keinen signifikanten Unterschied in der

Bindungsaffinität. Die K_D -Werte, die aus den kinetischen Parametern ermittelt wurden, lagen deutlich niedriger, als die K_D - und K_{Hill} Werte, die aus den Gleichgewichtszuständen abgeleitet werden konnten (nicht-linearer *steady-state fit* und Hill-Plot).

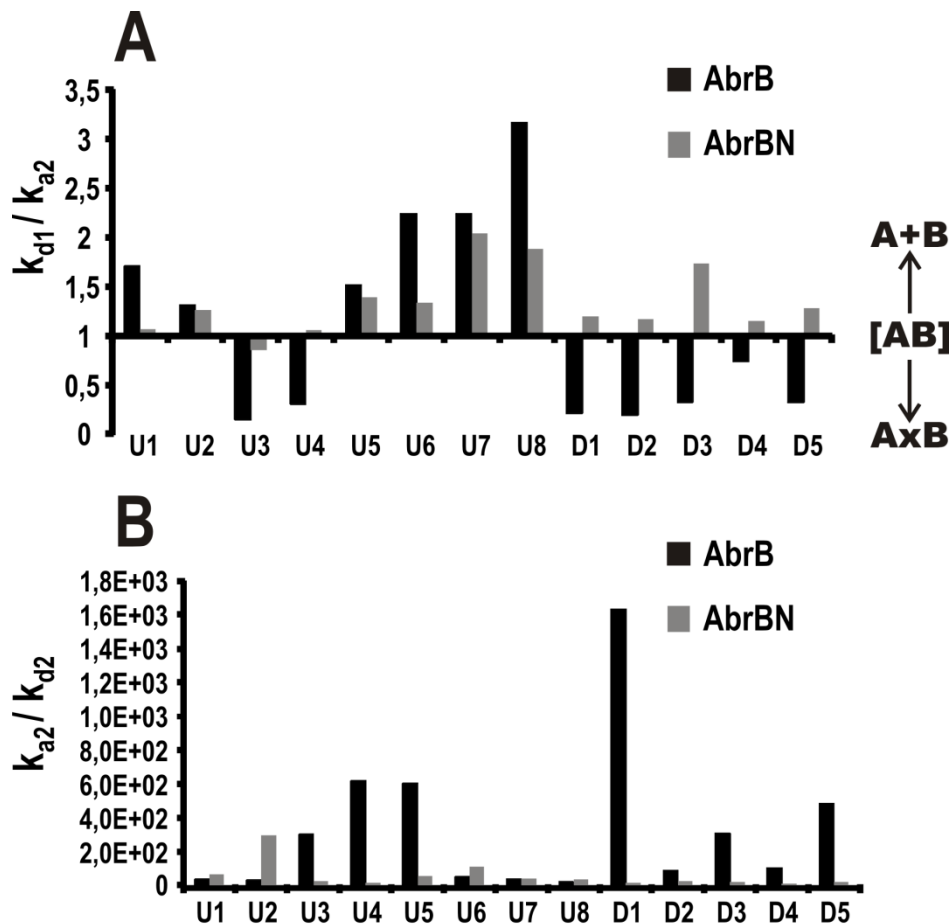


Abbildung 2.6: Diagramm-Darstellung der Quotienten k_{d1}/k_{a2} und k_{a2}/k_{d2} aller ds-Oligonukleotide bei der Bindung mit AbrB bzw. AbrBN.

(A) Beim k_{d1}/k_{a2} -Quotienten schneidet die horizontale Achse den y-Achsenwert 1, der den Gleichgewichtszustand von $[AB]$ darstellt. Die Balken mit den Werten kleiner als 1 zeigen nach unten. Rechts neben dem Balkendiagramm sind die Gleichgewichtsreaktionen des *Two-State-Reaction*-Modells dargestellt. Die Pfeile verdeutlichen die Richtung der Reaktionen. (B) Der k_{a2}/k_{d2} -Quotient stellt die Verschiebung des Gleichgewichtes der konformationellen Änderungen des AB-Zwischenkomplexes in Richtung $A \times B$ -Komplex dar.

2.1.2.4 Auswertung der Hill-Koeffizienten

Die sigmoiden Kurvenverläufe der Gleichgewichtskinetik verweisen auf positive kooperative Interaktion der Bindungsstellen (Voet *et al.* 2002). Deshalb konnten aus den linearen Hill-Plots $\log[R_{eq}/(R_{U_{max}}-R_{eq})]$ gegen $\log[Analyt]$ die Kooperativitäten der AbrB-Oligonukleotid-Bindungen abgeleitet werden (Abbildung 7.13, Anhang). Der Hill-Koeffizient n_{Hill} entspricht der Steigung der linearen Hill-Funktion (Voet *et al.* 2002). Der Wert für den Hill-Koeffizienten steigt mit dem Grad der Kooperativität einer Reaktion an und beschreibt damit in vereinfachter Form die Anzahl der kooperativen Bindungsstellen

im Liganden (AbrB-Protein). Ein AbrB-Tetramer enthält zwei DNA-Bindungsstellen, wobei jede Bindungstasche durch zwei N-terminalen Domänen geformt wird (Sullivan *et al.* 2008). Infolgedessen ist es möglich, dass zwei ds-Oligonukleotide an einen AbrB-Tetramer binden. In der Tat wurden die Hill-Koeffizienten von $n_{\text{Hill}} = 2,37$ für U3, $n_{\text{Hill}} = 2,07$ für U4, $n_{\text{Hill}} = 2,38$ für D1 und $n_{\text{Hill}} = 2,52$ für D4 bestimmt, woraus abgeleitet werden kann, dass mindestens zwei kooperative Bindungsstellen auf einem AbrB-Tetramer existieren. Einige DNA-Fragmente aus der ABS2 erbrachten sogar höhere Hill-Koeffiziente mit $n_{\text{Hill}} = 2,78$ für D2, $n_{\text{Hill}} = 3,58$ für D3 und $n_{\text{Hill}} = 2,99$ für D5. Somit zeigten die Oligonukleotide der Gruppe I bei der Bindung an *full-length* AbrB die Hill-Koeffizienten von $n_{\text{Hill}} > 2$ (Tabelle 2.1).

Die Oligonukleotide der Gruppe II lieferten Hill-Koeffizienten von $n_{\text{Hill}} \sim 1$ bei beiden Proteinen (Tabelle 2.1). Im Fall des AbrBN-Dimers, das nur eine DNA-bindende Stelle aufweist (Sullivan *et al.* 2008), wurde der $n_{\text{Hill}} \sim 1$ für alle Oligonukleotide bestimmt. Ein $n_{\text{Hill}} = 1$ beschreibt eine hyperbolische Kurve (Voet *et al.* 2002) und somit eine nicht-kooperative Bindungsreaktion zwischen den Oligonukleotiden beider Gruppen (I, II) und dem dimeren AbrBN.

2.1.2.5 Stöchiometrie der Komplexe

Mithilfe der SPR-Daten können unter Berücksichtigung der molekularen Massen, stöchiometrische Aussagen über die Bindungen getroffen werden. Da allerdings nicht bekannt war, wie viele der immobilisierten Proteine tatsächlich noch funktionell waren, konnte die Stöchiometrie der Komplexe nur annähernd angegeben werden. Aus den SPR-Messungen der GII-Oligonukleotide, die keine Kooperativität aufwiesen und die vergleichbare RU_{max} -Werte für die Bindung mit beiden Proteinen zeigten (zwischen 250 und 320 RU), konnte abgeleitet werden, dass sie in einem Verhältnis von 1:1 mit beiden Proteinen interagierten. Dies verdeutlichte auch, dass vergleichbare Mengen an beiden Proteinen auf dem Sensorchip aktiv waren. Demzufolge konnte die Stöchiometrie der AbrB- und AbrBN-Komplexe mit GI-Oligonukleotiden indirekt berechnet werden. Im Gegensatz zu den Interaktionen mit dem AbrBN zeigten die GI-Oligonukleotide zwei- bis dreifach höhere RU_{max} -Werte bei der Bindung mit dem *full-length* AbrB. Da ein AbrB-Tetramer zwei DNA-Bindungsstellen aufweist, ist es sehr wahrscheinlich, dass das Tetramer zwei GI-Oligonukleotide bindet, was einer Stöchiometrie von 2:1 (DNA:AbrB-Tetramer) entsprechen würde.

2.1.3 Bindungsparameter der Interaktion von AbrB mit dem Antirepressor AbbA

2.1.3.1 Kinetische Analysen der AbrB- und AbbA-Interaktionen

Auf die AbrB-Sensorchips wurden die AbbA-Proteine mit den Konzentrationen von 0,05 bis 4 μM appliziert und anschließend die Bindungsreaktionen in Echtzeit verfolgt (Methode, Kapitel 5.3.6.4). Die erhaltenen Sensorgramme für die einzelnen AbbA-Konzentrationen wurden graphisch dargestellt. Die Bindungskurven präsentierten die Interaktionen zwischen den AbbA-Proteinen aus *B. subtilis* (BS) bzw. *B. amyloliquefaciens* FZB45 (BA) und dem AbrB (BS und BA) bzw. AbrBN (Abbildung 2.7).

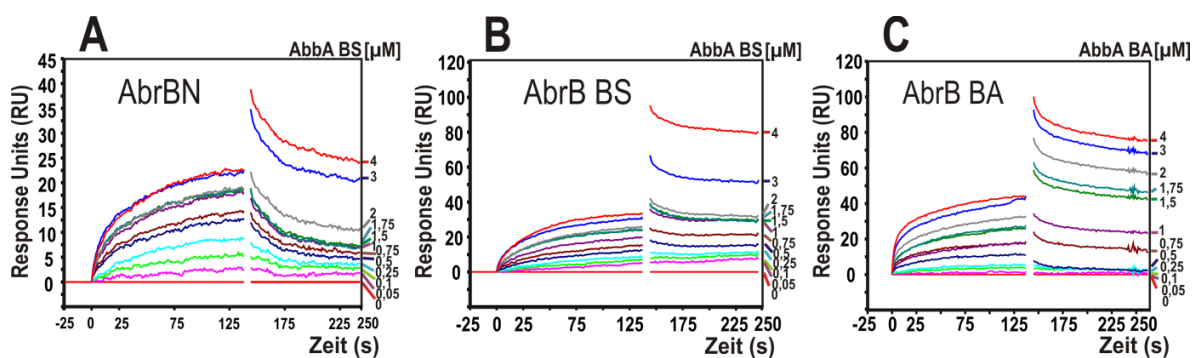


Abbildung 2.7: SPR-Sensorgramme der Interaktionen zwischen AbrB und seinem Antirepressor AbbA.

Die Bindungsreaktionen zwischen den Analyten AbbA aus *B. subtilis* 168 und dem verkürzten AbrB-Protein AbrBN (A) so wie (B) dem *full-length* AbrB. (C) Die Interaktionen zwischen AbbA und AbrB aus *B. amyloliquefaciens* FZB45. Das Messsignal wurde als *Response Units* (Bindungseinheiten – RU) über die Zeit dargestellt. Die unterschiedlichen Konzentrationen des Antirepressors AbbA (0,05 bis 4 μM) wurden über den Sensorchip geschickt. Die SPR-Kurven wurden nach dem Protokoll von Software BIAevaluation 3.1 normalisiert (Entfernung der Regenerierungsphase, Y-Transformierte, zero baseline).

Die SPR-Signale (*Response Units* - RU) stiegen in Abhängigkeit von den AbbA-Konzentrationen (0,05 bis 4 μM) während der Assoziationsphase an. Für die Berechnung der Bindungsparameter wurden verschiedene Bindungsmodelle aus dem Programm BIAevaluation ausgewählt. Das Anpassen (*fit*) erfolgte für jede Kurve meist separat (*local fit*). Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten (k_a und k_d) erfolgte unter Verwendung unterschiedlicher Gleichungen der folgenden Bindungsmodelle:

- 1:1-Langmuir-Modell: Auswertung der k_a/k_d -Werte erfolgte separat, bei der alle Dissoziations- bzw. Assoziationskurven gleichzeitig angepasst wurden (*separate, global fit*).
- 1:1-Langmuir-Modell: Auswertung der k_a/k_d -Werte erfolgte separat, bei der jede einzelne SPR-Kurve separat angepasst wurde (*separate, local fit*).

- *Two-State-Reaction*-Modell: *local fit*.
- *Bivalent-Analyte*-Modell: *local fit*.

Die für jedes Bindungsmodell verwendeten Gleichungen sind in Kapitel 5.3.6.5 erläutert. Das *Two-State-Reaction*-Modell $A+B \leftrightarrow [AB] \leftrightarrow AxB$ beschreibt eine durch AbrB-AbbA-Interaktion induzierte Konformationsänderung, die schrittweise zu einem stabileren Komplex zwischen dem AbrB und dem AbbA führt. Die Reaktionsraten des *Two-State-Reaction*-Modells wurden bereits in Kapitel 2.1.2.3 beschrieben. Das *Bivalent-Analyte*-Modell beschreibt die Interaktion zwischen dem immobilisierten Liganden und einem einzigen Analytmolekül, das zwei unabhängige Bindungsstellen aufweist. Da das AbbA-Protein in der nativen Form als ein Dimer vorliegt (FPLC: Abbildung 7.9), ist es gut vorstellbar, dass AbbA-Proteine über eine Dimerisierung eine zweiwertige Eigenschaft erlangen. Dabei könnte das zweiwertige Analytmolekül gleichzeitig mit zwei Liganden-Molekülen, oder den zwei Hälften des Ligandenmoleküls mit identischen Bindungseigenschaften reagieren. Der zweite Fall wurde bereits bei der Insulin-Insulinrezeptor-Interaktion beschrieben (De Meyts *et al.* 2002). Das zweiwertige Insulinmolekül bindet gleichzeitig die beiden Insulinrezeptorhälften (bivalentes Crosslinking). Es ist allerdings eher unwahrscheinlich, dass ein zweiwertiges AbbA-Molekül gleichzeitig zwei benachbarten AbrB-Tetramere binden könnte, da die Sensoroberfläche dünn beladen wurde. Das *Bivalent-Analyte*-Modell lieferte auch vier kinetische Parameter, bei denen die Geschwindigkeitskonstante k_{a2} die Einheit $[RU^{-1}s^{-1}]$ hat, weil der bei dem ersten Schritt gebildete AbrB-AbbA-Komplex (in RU) in die zweite Reaktion einbezogen wird (Kapitel 5.3.6.5, Gleichung (10)).

Die separate Auswertung der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_a mit dem 1:1 Langmuir-Modell, sowohl *local* als auch *global*, verlangte zuerst die Berechnung der k_d -Werte. Der *local fit* mit dem 1:1-Modell ergab bei den Bindungskurven von AbbA mit dem *full-length* AbrB zwar einen niedrigen χ^2 -Wert ($\chi^2 < 1\%$ des maximalen RU-Wertes), jedoch lieferten die *fits* von unterschiedlichen Bereichen der Assoziations- und Dissoziationsphasen keine einheitlichen kinetischen Parameter (Abbildung 7.14 und Tabelle 7.3, Anhang). Diese Ergebnisse sprachen daher für die komplexen Bindungsreaktionen. Die Auswertung der Bindungskurven von AbrBN mit AbbA BS lieferte einheitlichere Werte bei den Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und den Gleichgewichtskonstanten, was auf ein einfaches Bindungsverhalten innerhalb der AbrBN-AbbA-Interaktionen hinwies.

Da sich die SPR-Bindungskurven der AbbA-Proteine in Interaktion mit dem *full-length* AbrB mit beiden Bindungsmodellen, *Two-State-Reaction* und *Bivalent-Analyte*, analysieren

ließen, unterstützte dies die Vermutung, dass hier komplexe Bindungsreaktionen vorliegen müssten. Wohingegen beide Bindungsmodelle keine bzw. nur schlechte *fits*, mit hohen χ^2 -Werten ($\chi^2 > 1$ %) bei der Auswertung der SPR-Sensorgramme von AbrBN mit AbbA BS lieferten. Diese Ergebnisse bekräftigten das einfache Bindungsverhalten des verkürzten AbrB-Proteins (AbrBN) mit dem Antirepressor AbbA. Die aus den unterschiedlichen Bindungsmodellen abgeleiteten Bindungsparameter wurden in der Tabelle 2.3 dargestellt. Genauere Angaben zu den ermittelten Bindungsparametern mit dazu gehörigen Standardabweichungen wurden in Tabelle 7.4 (Anhang) zusammengefasst.

Tabelle 2.3: Die aus unterschiedlichen Bindungsmodellen abgeleiteten Bindungsparameter.

Die Auswertung erfolgte für Interaktionen zwischen AbrB bzw. AbrBN und dem Antirepressor AbbA mit BIAevaluation Software Version 3.1. BS = *Bacillus subtilis* 168, BA = *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45. Die *Two-State-Reaction* lieferte vier kinetische Parameter und die *apparent* Affinitätskonstante K_A der Gesamtreaktion mit der Einheit $[M^{-1}]$. K_D mit der Einheit $[M]$ wurde aus der K_A berechnet: $K_D = 1/K_A$. Das *Bivalent-Analyte*-Modell lieferte vier kinetische Parameter. K_A und K_D stehen für Gleichgewichtskonstanten der Gesamtreaktion und wurden aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten berechnet. K_{A1} und K_{D1} beschreiben die Affinität der ersten Bindungsreaktion. Bei dem *Bivalent-Analyte*-Modell hat k_{a2} die Einheit $[RU^{-1}s^{-1}]^{**}$ und K_A die Einheit $[RU^{-1}M^{-1}]^*$. Bei *Two-State-Reaction* ist k_{a2} mit der Einheit $[s^{-1}]$ unabhängig von der Molarität.

	AbrB BS : AbbA BS				AbrB N : AbbA BS		AbrB BA : AbbA BA			
	1:1 separate	Langmuir	bivalent	two-state	1:1 separate	Langmuir	1:1 separate	Langmuir	bivalent	two-state
	global	local	analyte	reaction	global	local	global	local	analyte	reaction
k_{a1} (1/Ms)	$2,49 \times 10^4$	$1,99 \times 10^4$	$5,02 \times 10^4$	$1,58 \times 10^5$	$1,01 \times 10^4$	$1,19 \times 10^4$	$1,30 \times 10^4$	$1,26 \times 10^4$	$8,22 \times 10^4$	$1,32 \times 10^5$
k_{d1} (1/s)	$7,2 \times 10^{-3}$	$3,09 \times 10^{-3}$	$1,28 \times 10^{-3}$	$1,57 \times 10^{-1}$	$1,54 \times 10^{-2}$	$7,24 \times 10^{-3}$	$1,15 \times 10^{-2}$	$1,08 \times 10^{-2}$	$2,54 \times 10^{-3}$	$9,55 \times 10^{-2}$
k_{a2} (1/RUs)**			$3,82 \times 10^{-2}$	$2,99 \times 10^{-2}$					$2,78 \times 10^{-2}$	$1,78 \times 10^{-2}$
k_{d2} (1/s)			$4,96 \times 10^{-2}$	$1,16 \times 10^{-3}$					$2,25 \times 10^{-2}$	$1,58 \times 10^{-3}$
K_{A1} (1/M)			$5,71 \times 10^7$	$1,01 \times 10^6$					$3,34 \times 10^7$	$1,33 \times 10^6$
K_A (1/M)*	$3,72 \times 10^6$	$8,55 \times 10^6$	$6,89 \times 10^6$	$4,05 \times 10^8$	$6,56 \times 10^5$	$1,74 \times 10^6$	$1,32 \times 10^6$	$1,23 \times 10^6$	$3,18 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
K_{D1} (M)			$5,94 \times 10^{-8}$	$1,23 \times 10^{-6}$					$3,45 \times 10^{-8}$	$7,91 \times 10^{-7}$
K_D (M)	$7,85 \times 10^{-7}$	$2,96 \times 10^{-7}$	$1,45 \times 10^{-7}$	$4,78 \times 10^{-8}$	$3,7 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$1,14 \times 10^{-6}$	$1,24 \times 10^{-6}$	$3,14 \times 10^{-8}$	$6,89 \times 10^{-8}$
χ^2 [%]	0,39	0,88	0,45	0,17	0,31	0,54	0,38	1,57	0,65	0,19

Die SPR-Sensorgramme der AbrB-AbbA-Interaktionen (Abbildung 2.7) zeigten eine langsame Dissoziation und somit eine stabile Komplexbildung. Die Geschwindigkeitskonstanten, die mit dem *Two-State-Reaction*-Modell berechnet wurden, zeigten deutlich, dass die Konformationsänderung (2. Reaktion) den Komplex zwischen dem *full-length* AbrB und dem AbbA-Protein stabilisierte. Denn der erste Satz an kinetischen Parametern zeigte, dass die erste Reaktion schnell (k_{a1} lag bei $1,32 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ bzw. $1,58 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$) und instabil erfolgte (k_{d1} lag bei $9,55 \times 10^{-2} s^{-1}$ bzw. $1,57 \times 10^{-1} s^{-1}$). Die Reaktionsraten der zweiten Reaktion, die die Konformationsänderung präsentieren, zeigten eine langsame und stabile Komplexbildung. Die Dissoziationskonstanten bestätigten die Annahme, dass das Gleichgewicht auf der Seite der Konformationsänderung liegt, da der K_D -Wert der Gesamtreaktion ($4,78 \times 10^{-8} M$ bei AbrB

BS) deutlich niedriger als K_{D1} der ersten Reaktion ($1,23 \times 10^{-6}$ M) war. Bei den AbrB-AbbA-Interaktionen aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 machte der K_D -Wert den Unterschied zwischen dem einfachen und komplexen Bindungsmodell viel deutlicher. Denn die Dissoziationskonstanten der 1:1-Langmuir-Berechnungen lagen mit K_D $1,14 \times 10^{-6}$ bzw. $1,24 \times 10^{-6}$ M höher als die K_D -Werte der komplexen Bindungsreaktionen.

Das *Bivalent-Analyte*-Modell lieferte zwei unterschiedliche Sätze an kinetischen Parameter, was vermuten lässt, dass bei der AbrB-AbbA-Interaktion kooperative Effekte zum Tragen kommen könnten (BiacoreAB 1999, Jones *et al.* 2004). Die zweite Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation war bei den beiden *full-length* AbrB-Proteinen höher als die erste, was darauf deutete, dass die erste Bindungsreaktion des zweiwertigen AbbA-Proteins an AbrB stabiler war. Die beiden Dissoziationskonstanten K_{D1} und K_D zeigten kaum einen Unterschied bei AbrB BA, der K_{D1} -Wert bei AbrB BS war etwas niedriger. Es könnte ein Indiz dafür sein, dass das bivalente AbbA-Molekül eine Bindungstasche, die aus zwei N-terminalen Domänen (zwei AbrB-Proteinhälften) geformt wird, bindet und dadurch innerhalb des AbrB-Moleküls negative Effekte auslöst, so dass die Affinität der Gesamtreaktion entweder gleich bleibt oder vermindert wird.

Da das dimere AbrBN-Protein, das eine DNA-bindende Domäne umfasst, auch eine stabile Bindung mit dem AbbA-Protein aufwies, ist deshalb gut vorstellbar, dass AbbA dieselbe Bindungsstelle auf dem AbrB wie die Ziel-DNA bindet. Ein einfaches Bindungsverhalten des verkürzten AbrBN mit dem Antirepressor AbbA BS könnte darauf hindeuten, dass die C-terminalen Domänen für die auslösenden Effekte, wie die Konformationsänderungen innerhalb des AbrB-AbbA-Komplexes (*Two-State-Reaction*) und die kooperativen Effekte (*Bivalent-Analyte*-Modell) erforderlich sind.

2.1.3.2 Parameter der negativen Kooperativität

Die SPR-Bindungskurven zeigten einen deutlichen Assoziationsverlauf, bei dem die Kurve nach einer Zeit abflachte und in den Gleichgewichtsbereich (*steady-state*) überging (Abbildung 2.8). Die im *steady-state* abgelesenen RU-Signale wurden als eine Funktion der entsprechenden AbbA-Konzentrationen aufgetragen und die resultierenden, thermodynamischen Bindungskurven mit Hilfe der BIAevaluation Software an die *general fitting*-Modelle unter Nutzung der Gleichung *steady-state affinity* (Kapitel 5.3.6.5, Gleichung (2)) und *4-parameter-equation* (Gleichung (3)) angepasst. Beide *general fitting*-Modelle lieferten auswertbare *fits* der thermodynamischen Bindungskurven mit niedrigen χ^2 -Werten ($\chi^2 > 1$ %), sowohl für AbrBN als auch für *full-length* AbrB. Der AbrB-Antirepressor AbbA zeigte bei der Bindung mit AbrBN einen hyperbolischen Kurvenverlauf (Abbildung 2.8 A), der eine einfache Bindung beschreibt (Voet *et al.* 2002). Die

Interaktion von *full-length* AbrB mit AbbA zeigte einen Kurvenverlauf, der von einer Hyperbel durch einen flachen Anstieg stark abwich. Die Lineweaver-Burk-(doppeltreziproke)-Auftragung der Gleichgewichtsbindungsdaten sollte das Bindungsverhalten durch die verlaufende Kurvenform verdeutlichen (Hammes 2000). Das AbrBN zeigte bei der Interaktion mit AbbA einen linearen Kurvenverlauf, was ein nicht-kooperatives Bindungsverhalten widerspiegelt (Abbildung 2.8 B). Bei der AbrB-AbbA-Bindung nimmt die Kurve bei niedrigen AbbA-Konzentrationen einen zur Y-Achse rechtsgebogenen Verlauf an, was für eine negative Kooperativität bereits beschrieben wurde (Hammes 2000).

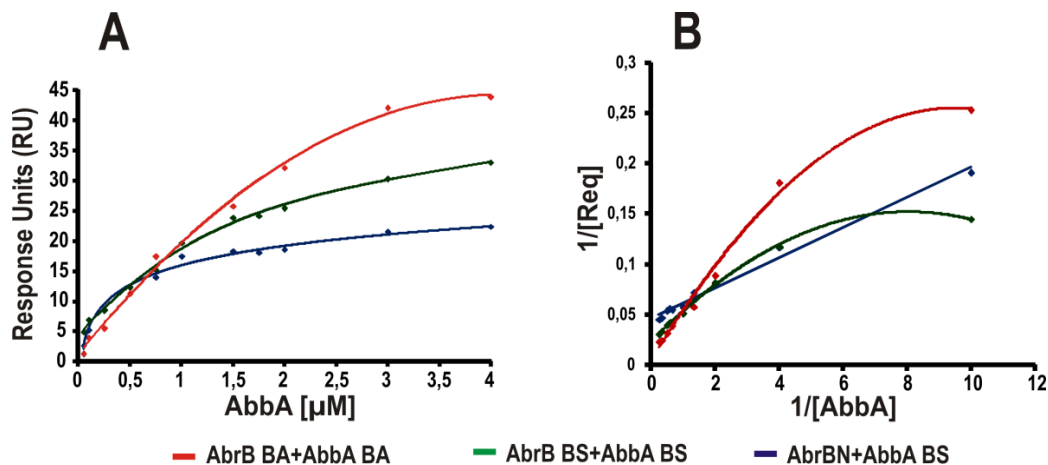


Abbildung 2.8: Darstellung der Gleichgewichtsbindungsdaten.

(A) Darstellung der *Response Units* (RU) aus den *steady-state*-Bereichen der Assoziationsphasen (R_{eq}) als Funktionen der AbbA-Konzentrationen $[\mu\text{M}]$. (B) Lineweaver-Burk-(doppeltreziproke)-Auftragung: Darstellung von $1/R_{eq}$ ($1/RU$) als Funktionen der $1/AbbA$ ($1/[\mu\text{M}]$).

Beide *general fitting*-Modelle ermöglichten eine Anpassung der thermodynamischen Bindungskurve sowohl für AbrBN als auch für *full-length* AbrB und lieferten die Dissoziationskonstanten K_D . Die Gleichgewichtskonstanten der Dissoziation konnten auch aus dem Hill-Plot abgeleitet werden (Tabelle 2.4). Bei der doppelt-logarithmischen Hill-Auftragung von $\log[R_{eq}/(R_{max}-R_{eq})]$ gegen $\log[AbbA]$ lieferte der Abszissenabschnitt die Dissoziationskonstante K_{Hill} und die Steigung den Hill-Koeffizienten (Anhang, Abbildung 7.15). Die beobachteten K_D -Werte aus den beiden Methoden (*general fitting*-Modell und Hill-Plot) lagen in einem mikromolaren Bereich. Die Dissoziationskonstanten K_D , die aus den kinetischen Parametern abgeleitet wurden (Tabelle 2.3), zeigten bei dem AbrBN dieselbe Größenordnung, die K_D -Werte von *full-length* AbrB lagen bei den komplexen Bindungsmodellen deutlich niedriger.

Im Fall des AbrBN-Dimeres, das nur eine DNA-bindende Stelle aufweist (Sullivan *et al.* 2008), wurde bei der Interaktion mit AbbA ein Hill-Koeffizient $n_{Hill} \sim 1$ bestimmt (Tabelle 2.4), wodurch man dieser Interaktion eine nicht-kooperative Bindungsreaktion zugrunde legen konnte. Das AbrB BS-Tetramer zeigte bei der Bindung mit AbbA BS Hill-Koeffizienten

n_{Hill} von 0,77 bzw. 0,89, bei der AbrB-AbbA BA-Interaktion wurden Hill-Koeffizienten n_{Hill} von 0,75 bzw. 0,93 bestimmt. Geht man von dem *4-parameter-equation*-Modell aus, so lagen die Hill-Koeffizienten für die Interaktionen der AbbA-Proteine mit den AbrB-Proteinen bei $n_{\text{Hill}} < 1$, was auf ein negativ kooperatives Bindungsverhalten hindeuten könnte. Bei der negativen Kooperativität senkt die Bindung eines Moleküls an die erste Bindungsstelle die Affinität der anderen Bindungsstellen (Voet *et al.* 2002).

Eine am häufigsten gebrauchte graphische Darstellung zur Analyse der Bindungsdaten ist der Scatchard-Plot, der 1949 von George Scatchard entwickelt wurde. Die Verlaufsform der Scatchard-Darstellung liefert ein besseres Verständnis der Bindungsereignisse (Bordbar *et al.* 1996). Der Scatchard-Plot wurde als eine Funktion von $R_{\text{eq}} (\text{RU}) / C_{\text{Analyt}} [\text{nM}]$ gegen die $R_{\text{eq}} (\text{RU})$ dargestellt. Die Interaktion von AbrBN mit AbbA lieferte einen linearen Scatchard-Plot (Abbildung 2.9 A), der mit dem einfachen 1:1-Modell (Langmuir) übereinstimmt (De Meyts 1994). Ein nicht-linearer Scatchard-Plot deutet auf eine komplexe Bindung hin (Bordbar *et al.* 1996). Bei den *full-length* AbrB-Proteinen wurden kurvenförmige Scatchard-Plots beobachtet (Abbildung 2.9 B und C), die darauf hindeuteten, dass die Affinitäten der Reaktionen über den Sättigungsbereich nicht einheitlich waren. Bei der Insulin-Bindung an den dimeren Insulin-Rezeptor, bei der eine negative Kooperativität beschrieben wurde, lieferten die Bindungsdaten auch einen kurvenlinearen Scatchard-Plot, der auf die Koexistenz von hoch- und niedrigaffinen Bindungsstellen hinweist (De Meyts *et al.* 2002).

Tabelle 2.4: Dissoziationskonstanten K_{Hill} - und K_{D} , RU_{max} -Werte und Hill-Koeffizienten.

Die Dissoziationskonstanten (K_{D}) und RU_{max} -Werte wurden direkt mit den *steady-state fitting* Modellen (*steady state affinity* und *4-parameter equation*) berechnet. Der Hill-Koeffizient n_{Hill} wurde aus der Steigung und der K_{Hill} -Wert aus dem Abszissenabschnitt der linearen Hill-Funktion abgeleitet.

	4-parameter-equation				steady-state affinity			
	K_{D} (M)	RU_{max}	K_{Hill} (M)	n_{Hill}	K_{D} (M)	RU_{max}	K_{Hill} (M)	n_{Hill}
AbrBN-AbbA	$0,84 \times 10^{-6}$	28	$0,85 \times 10^{-6}$	0,92	$0,49 \times 10^{-6}$	24	$0,47 \times 10^{-6}$	1
AbrB BS-AbbA BS	$1,23 \times 10^{-6}$	35,4	$1,16 \times 10^{-6}$	0,89	$1,17 \times 10^{-6}$	41,4	$1,08 \times 10^{-6}$	0,77
AbrB BA-AbbA BA	$3,95 \times 10^{-6}$	62	$4,1 \times 10^{-6}$	0,75	$3,23 \times 10^{-6}$	79,5	$3,81 \times 10^{-6}$	0,93

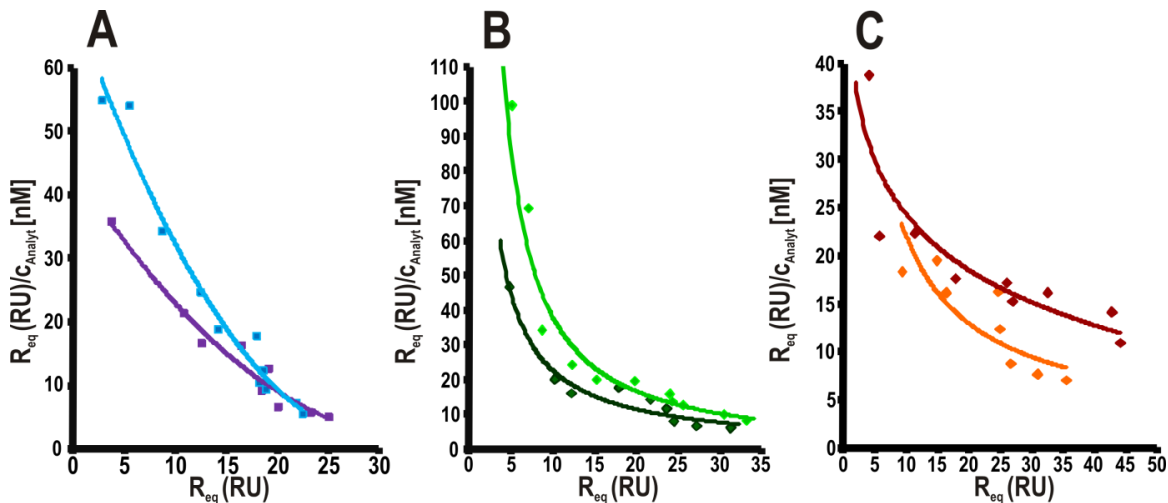


Abbildung 2.9: Scatchard-Plots von AbbA-Bindung.

(A) Linearer Plot von AbbA-Bindung an AbrBN. (B) Kurvenförmiger Plot bei der Bindung von AbbA BS an *full-length* AbrB BS und (C) bei der Bindung von AbbA BA an *full-length* AbrB BA. Jeweils zwei Scatchard-Plots wurden entsprechend aus zwei Messungen mit unterschiedlichen AbbA-Konzentrationen (0,05 bis 5 µM) abgeleitet.

2.2 In vitro Bindungsuntersuchungen von AbrB und AbbA

2.2.1 Chemische Interferenz-Footprintanalysen

Die DNaseI-Footprintanalysen zeigten, dass für die Bindung von AbrB an den *phyC*-Promotor aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 zwei große Sequenzbereiche, die 162 bp voneinander getrennt vorliegen, erforderlich sind (Makarewicz *et al.* 2008) (Abbildung 2.10). Wurden die Bindungsstellen einzeln angeboten, konnten keine geschützten Bereiche sichtbar gemacht werden (Daten nicht gezeigt).

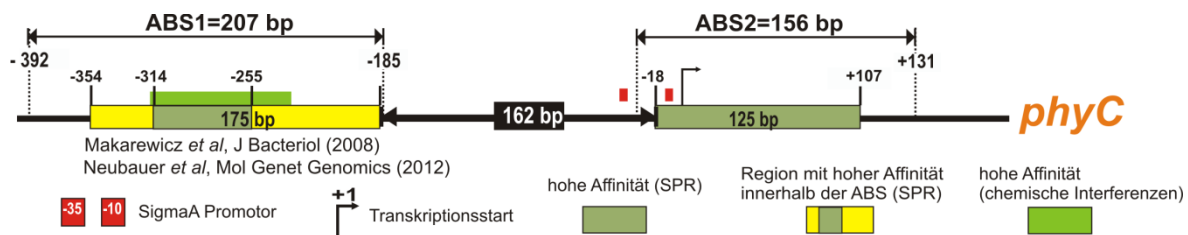


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der ^{32}P -markierten AbrB-Bindungsstellen ABS1 und ABS2 des *phyC*-Promotors.

Die ABS1 (PCR-Produkt von $[^{32}P]$ Sn4/Sn3 bzw. Sn4/ $[^{32}P]$ Sn3) und ABS2 (PCR-Produkt von $[^{32}P]$ F3for/F3rev bzw. F3for/ $[^{32}P]$ F3rev) wurden für die Bindungsassays mit dem AbrB-Protein aus *B. subtilis* verwendet. Die bp-Größe innerhalb der ABS-Boxen verdeutlicht den geschützten Größenbereich der ABSs, die aus DNaseI-Footprinting abgeleitet wurde: ABS1 (175 bp) befindet sich *upstream* von *phyC*-Promotor im Bereich von -354 bis -180. ABS2 (125 bp) liegt im Bereich von -18 bis +107 (Makarewicz *et al.* 2008). Die unterschiedlichen Affinitäten von AbrB zu beiden ABSs sind durch unterschiedliche Farben verdeutlicht. Die hochaffine Region innerhalb ABS1 wurde sowohl mit der SPR-Methode als auch mit den chemischen Interferenz-Footprints festgelegt (Neubauer *et al.* 2012). Positionen sind relativ zum *phyC*-Transkriptionsstartpunkt.

Die DNaseI-Footprintanalyse beider Stränge ermöglichte eine gute Aussage über den Bindungsbereich auf der DNA, der vom Protein sterisch abgedeckt wird. Diese Methode liefert keine Aussage, weder mit welchen Basen der DNA das Protein interagiert noch an welchen der DNA-Stränge das Protein bindet, denn die DNaseI schneidet immer beide Stränge, auch wenn die Proteininteraktion mit nur einem davon erfolgt. Chemische Interferenz-Footprints, bei denen die Basen spezifisch mit unterschiedlichen chemischen Agenzien modifiziert werden, ermöglichen ein genaueres Mapping der Basen, die durch das AbrB-Protein innerhalb der beiden Bindungsstellen kontaktiert werden.

Bei den Interferenz-Footprints wurden die ^{32}P -markierten DNA-Fragmente zuerst modifiziert, bevor sie mit dem AbrB-Protein aus *B. subtilis* gemischt wurden (Methode, Kapitel 5.2.14). Durch diese Modifizierung wurden bestimmte Basen so verändert, dass sie die Bindung des Proteins an diesen Positionen verhinderten (Siebenlist *et al.* 1980, Licht *et al.* 2006). Die mit Protein inkubierte, modifizierte DNA wurde in einem nativen Polyacrilamidgel getrennt (Methode, Kapitel, 5.2.12.2). Dabei wurde die Proteinkonzentration so gewählt, dass ca. die Hälfte der DNA gebunden vorlag. Die gebundenen und ungebundenen DNA-Fractionen wurden aus dem Gel extrahiert (Abbildung 2.11) und die durch das Protein kontaktierten Basen in einer denaturierenden Acrylamidgelelektrophorese (Kapitel 5.2.14.2) als abgeschwächte Banden, im Vergleich zur ungebundenen Fraktion und der unbehandelten Kontrolle, sichtbar.

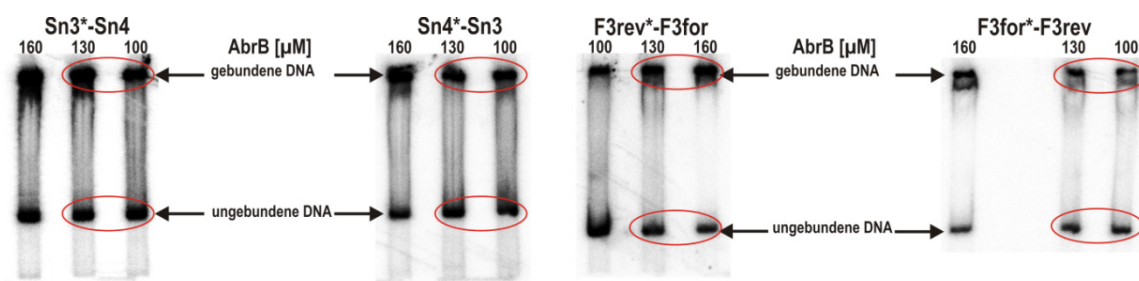


Abbildung 2.11: Präparation der methylierten DNA aus den nativen Gelretardationsgelen.

Die einzelnen *forward* und *reverse* Primer, wie Sn4- bzw. Sn3, wurden für die Herstellung der AbrB-Bindungsstelle 1 (*upstream* DNA-Bereich von -392 bis -185) und F3for bzw. F3rev für die Herstellung der AbrB-Bindungsstelle 2 (*downstream* DNA-Bereich von -25 bis +131) markiert (*). Die markierte und methylierte DNA (200000 cpm pro Ansatz) wurde mit drei unterschiedlichen AbrB-Konzentrationen (100, 130, 160 μM), bei der die DNA zur Hälfte gebunden lag, gemischt. Die DNA-Ansätze wurden in einem nativen 6 %-igen Acrylamid/ 1 x TBE-Gel getrennt und aus dem Gel ausgeschnitten (rote Kreise). Die mit KMnO_4 modifizierte DNA wurde mit AbrB aus *B. subtilis* in den Konzentrationen von 60, 80 und 100 μM und die NH_2OH -modifizierte DNA mit AbrB von 5, 20 und 40 μM inkubiert (die Abbildung nicht gezeigt). Von der KMnO_4 - und NH_2OH -modifizierten DNA wurden auch 200000 cpm pro Ansatz verwendet.

2.2.1.1 Mapping der Kontaktstellen innerhalb der ABS1

Die AbrB-Bindungsstelle ABS1 mit ihren 175 Basenpaaren ist ungewöhnlich groß im Vergleich zu den meisten der bekannten AbrB-Bindungsstellen, deren Größen zwischen 24 bp für *sinIR* (Shafikhani *et al.* 2002) und 120 bp für *yknW* (Qian *et al.* 2002) liegen. Die SPR-Daten zeigten für ABS1 starke Unterschiede im Bindungsverhalten von AbrB aus *B. subtilis* zu den angebotenen ds-Oligonukleotiden, von denen nur eine kleine Region von -315 bis -255 (Oligonukleotide U3 und U4) eine hohe Affinität und Kooperativität zum Protein aufwies. Um die bei der Bindung beteiligten Basen zu bestimmen, wurden chemische Interferenz-Footprints mit KMnO_4 , NH_2OH und DMS-modifizierter ABS1-DNA durchgeführt.

Die besten Ergebnisse lieferten die KMnO_4 -Interferenz-Footprints (Abbildung 2.12). KMnO_4 ist ein starkes Oxidationsmittel und oxidiert spezifisch Thymine an der 5,6-Doppelbindung (Kapitel 5.2.14.3, Abbildung 5.2). Das KMnO_4 zeigt auch eine schwächere Reaktivität zu den anderen Basen ($\text{dT} > \text{dC} > \text{dG}$, dA) und verursacht hauptsächlich für C- und G-Reste einen schwachen Hintergrund auf dem Gel (Rubin *et al.* 1980). Die Reaktivität von KMnO_4 hängt stark von der Sekundärstruktur der DNA ab. Eine doppelsträngige DNA wird aufgrund der sterischen Hinderung durch die Basen-Stappellung erst sehr schwach und auch nur bei hohen KMnO_4 -Konzentrationen attackiert, während eine einzelsträngige DNA schon bei niedrigen KMnO_4 -Konzentrationen und einem neutralen pH-Wert stark modifiziert wird (Hayatsu *et al.* 1967). Aus diesem Grund erfolgte die Modifizierung der DNA unter ungepufferten Bedingungen, mit einem niedrigen Ionengehalt, was aus der kinetischen und thermodynamischen Sicht die Basenpaar-Denaturierung begünstigt (Hayatsu *et al.* 1967).

ABS1 lieferte eine starke Interferenz an fünf Thymin-Positionen (-231, -240, -241, -262 und -284) des *reverse* Stranges und an vier Thymin-Positionen (-249, -300, -303 und -304) des *forward* Strangs. Die Banden für diese Thymine waren sowohl in der Kontrollreaktion als auch in der ungebundenen DNA-Fraktion vorhanden, während sie in der gebundenen Fraktion fehlten. Interessanterweise wurden auch einige modifizierten Guanine und zwei Adenine gefunden, die die AbrB-Bindung an DNA stark herabsetzten: A(-251), G(-281) und G(-301) am *reverse* Strang und G(-234), A(-284), G(-293) und G(-294) am *forward* Strang. Auf dem *forward* Strang zeigten viele Thymine und zwei Guanine schwache Interferenz-Signale (weiße Pfeile, Sn4, Abbildung 2.12 A). In diesem Fall waren die Basen in der gebundenen Fraktion noch sichtbar, jedoch deutlich schwächer im Vergleich zu der ungebundenen Fraktion.

Die Guanin- und Adenin-Basen, die mit AbrB in Wechselwirkung traten, wurden anhand der DMS-Interferenz-Footprints bestimmt. Das Dimethylsulfat (DMS) methyliert

Adenine an der Position N3 in der kleinen Furche und Guanine an der Position N7 in der großen Furche (Siebenlist *et al.* (1980); Kapitel 5.2.14.1, Abbildung 5.1).

Es wurden hier hauptsächlich schwache Interferenz-Signale auf beiden Strängen gefunden, wobei es sich überwiegend um Adenine gehandelt hatte. Einige Positionen konnten bereits bei den KMnO_4 -Interferenz-Footprints bestimmt werden: A(-251), G(-281) und G(-294) als starke Signale und G(-282) als ein schwaches Signal. Die weiteren durch das DMS modifizierten Adenine befanden sich an den Positionen -249 und -254 auf dem *reverse* Strang, während an denselben Positionen auf dem *forward* Strang die durch KMnO_4 modifizierten Thyminе ebenfalls Interferenzen zeigten. Signale *upstream* von -292 auf dem *reverse* Strang waren zu schwach, so dass hier keine Interferenzmuster erkennbar waren. Eine vergleichbare Problematik wies auch die Auswertung des *forward* Strangs *downstream* von -219 auf.

Die Modifizierung mit dem Hydroxylamin (NH_2OH) diente dazu, die Bindung von AbrB an Cytosinreste festzustellen. Das Hydroxylamin ist ein starkes Reduktionsmittel und wird an die 5,6-Doppelbindung von Cytosin addiert, was zu einer internen Neuordnung und Spaltung der Ringstruktur führt (Kapitel 5.2.14.5, Abbildung 5.3) (Phillips 1967, Kochetkov *et al.* 1972). Auf diesem Weg wird die Kontaktausbildung zwischen dem Protein und der DNA verhindert.

Hier konnten nur zwei Cytosine bestimmt werden, die mit AbrB wechselwirken könnten: C(-230) als schwaches Interferenz-Signal auf dem nicht-kodierenden Strang und C(-292) als starkes Signal auf dem kodierenden Sn4-Strang. Allerdings wurden hierbei auf dem *reverse* Strang einige Thyminе gefunden, die an der Bindung mit AbrB beteiligt sein könnten. Darunter waren solche, die schon durch KMnO_4 -Modifikation identifiziert wurden: Positionen -223, -240, -241, -262 und -284. Zusätzlich waren noch relevante Thyminе an den Positionen -199, -202 und -250 entdeckt worden. Interessanterweise wurde eine starke Guanin-Kontaktstelle auf dem *reverse* Strang beobachtet, die ebenfalls schon vorher bei KMnO_4 - und DMS-Interferenz-Footprinting bestimmt werden konnte.

Mittels der chemischen Interferenz-Footprints konnte eine relativ kurze hochaffine Region innerhalb ABS1 abgeleitet werden, die von ca. -316 bis -230 reicht und damit gut mit der mittels SPR ermittelten Kernregion übereinstimmt. Hier scheinen hauptsächlich Thyminе und Guanine für den direkten Kontakt mit dem AbrB wichtig zu sein.

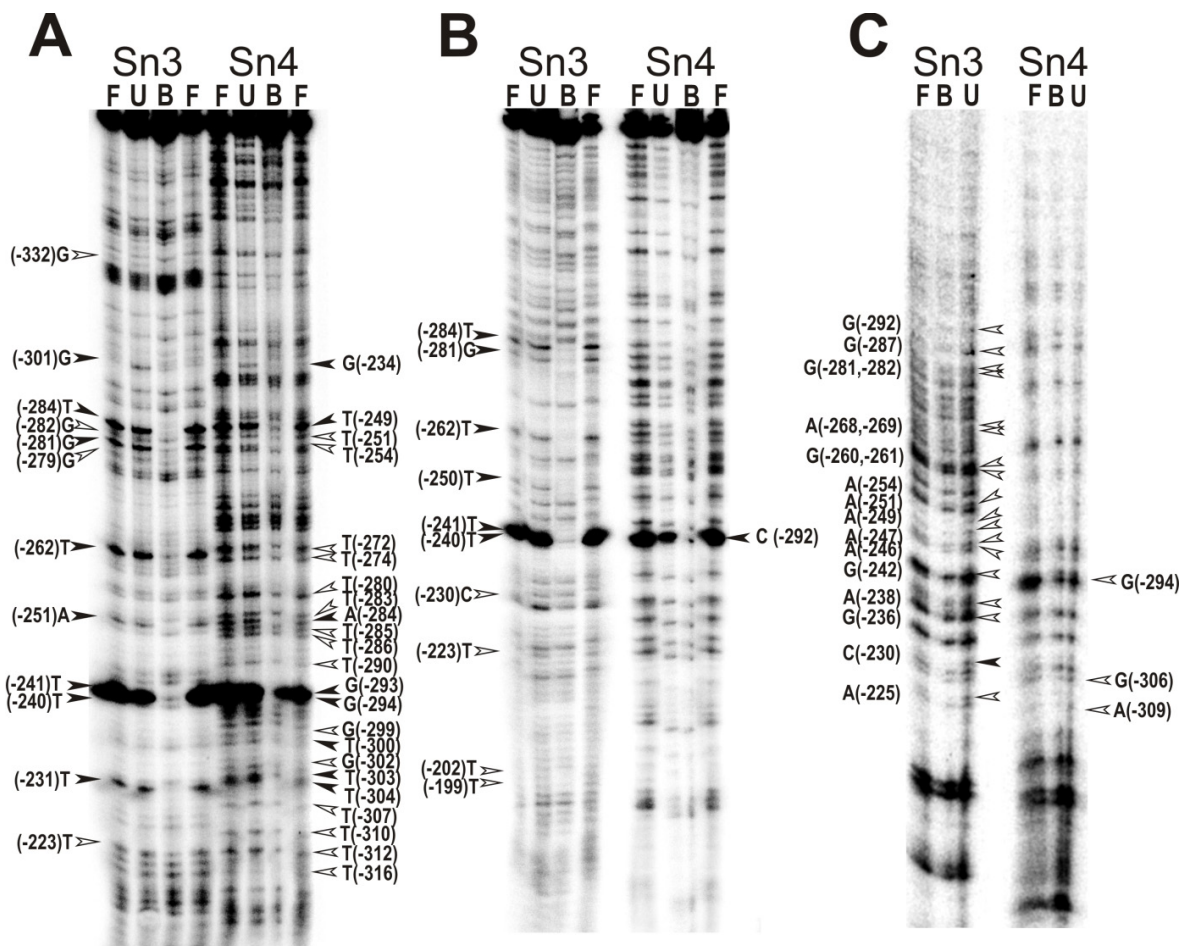


Abbildung 2.12: Chemische Interferenz-Footprintassays der ABS1-Region.

Radioaktiv 5'-markierte DNA an dem kodierenden Strang (Sn4) und dem nicht-kodierenden Strang (Sn3) war durch (A) Kaliumpermanganat (KMnO_4), (B) Hydroxylamin (NH_2OH) und (C) Dimethylsulfat (DMS) modifiziert und für AbrB-Bindungsreaktionen verwendet. In präparativen Gelretardationsassays wurden die ungebundene DNA (als U dargestellt) und die gebundene DNA (als B dargestellt) aus dem nativen Polyacrylamidgel extrahiert (Methodenteil 5.2.12.2; Abbildung 2.11). Sowohl die proteinfreien Kontrollreaktionen (als F bezeichnet), die nur modifizierte DNA enthielten, als auch präparierten U- und B-Proben wurden mit Piperidin behandelt (Kapitel 5.2.14.1, Abbildung 5.1) und anschließend zu dem gleichen cpm-Anteil (mindestens 5000 cpm) auf ein 6 %-iges Acrylamid/ 7 M-Harnstoff/ 1 x TBE-Gel geladen (Kapitel 5.2.14). Schwarze Pfeile zeigen starke Signale und weiße Pfeile schwache Signale. Die Zahlen in Klammern zeigen die bp-Position relativ zum Transkriptionsstartpunkt +1 von *phyc*.

2.2.1.2 Mapping der Kontaktstellen innerhalb der ABS2

Die Interferenz-Footprintanalyse der ABS2-Region wiesen weniger starke Kontaktstellen mit dem AbrB auf (Abbildung 2.13). Bei den KMnO_4 -Footprints des nicht-kodierenden Stranges (F3rev) konnten keine eindeutigen Basenpositionen terminiert werden, da die gesamte gebundene DNA-Fraktion nur schwache Signale im Vergleich zur ungebundenen und der Kontroll-Fraktion zeigte. Das könnte ein Indiz dafür sein, dass AbrB hier über die gesamte Fragmentlänge stark mit den Basen interagiert hat. Auf dem kodierenden Strang (F3for) konnten einige abnehmende Signale für Thyminbasen

identifiziert werden: T(+29), T(+33), T(+36), T(+37), T(+70), T(+74), T(+77) und T(+82).

Die Methylierung-Interferenz-Assays (DMS) von ABS2 brachten weniger stringente Kontaktstellen für den *reverse* Strang (F3rev) und viele schwache Guanin-Signale für den *forward* Strang (F3for). Wohingegen, bei den Hydroxylamin-Footprints keine Unterschiede zu finden waren (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass im Fall von ABS2, in der anscheinend viele Basen mit AbrB interagieren, sich die vermeintlichen Kontaktstellen mittels der chemischen Interferenz-Footprints nur schwer bestimmen lassen.

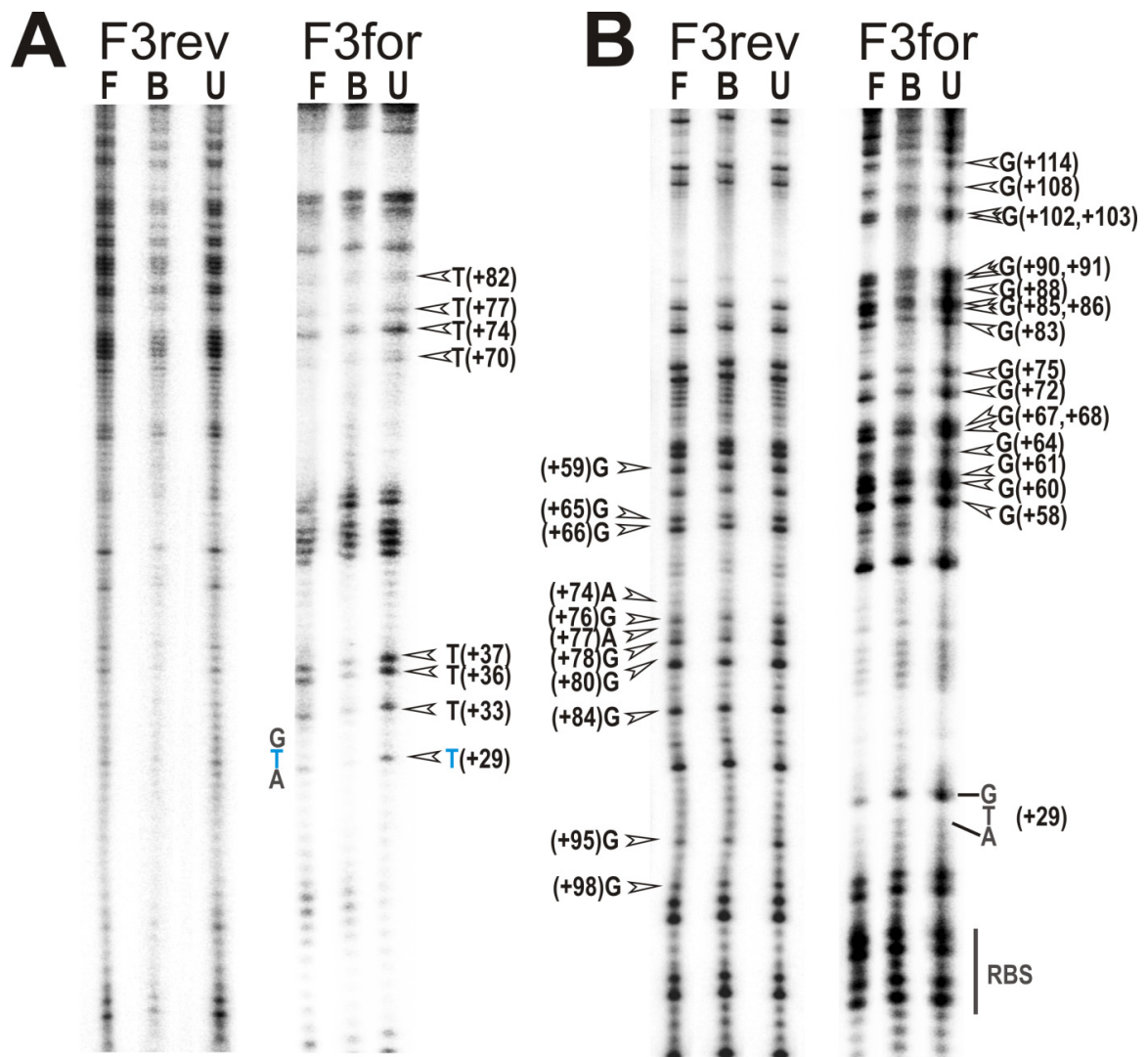


Abbildung 2.13: Chemische Interferenz-Footprintassays der ABS2-Region.

Radioaktiv 5'-markierte DNA an dem kodierenden Strang (F3for) und dem nicht-kodierenden Strang (F3rev) war durch (A) Kaliumpermanganat (KMnO₄) und (B) Dimethylsulfat (DMS) modifiziert und für AbrB-Bindungsreaktionen verwendet. Die ungebundene DNA wird als U, die gebundene DNA als B und die proteinfreie DNA-Probe (Kontrolle) als F bezeichnet. Die B/U/F-Proben wurden mit Piperidin behandelt (Kapitel 5.2.14.1, Abbildung 5.1) und anschließend zu dem gleichen cpm-Anteil (mindestens 5000 cpm) auf ein 6 %-iges Acrylamid/ 7 M-Harnstoff/ 1 x TBE-Gel beladen (Kapitel 5.2.14). Weiße Pfeile zeigen schwache Signale. Die Zahlen in Klammern zeigen die bp-Position relativ zum Transkriptionsstartpunkt +1 von *phyC*.

2.2.2 Auswirkung der ABS1-Kernregion auf die Transkription

In vorherigen Experimenten konnte demonstriert werden, dass für die Hemmung von *phyC* durch AbrB die Anwesenheit beider Bindungsstellen (ABS1 und ABS2) erforderlich war (Makarewicz *et al.* 2008). Ferner wiesen die SPR-Daten darauf hin, dass innerhalb der ABS1 nur ein kurzer Bereich mit AbrB eine starke Wechselwirkung zeigt.

Um die Funktionalität dieser Kernregion zu untersuchen, wurden zwei DNA-Bereiche, die bei den chemischen Interferenz-Footprintassays starke Kontaktstellen bei der AbrB-DNA-Bindung aufwiesen, substituiert (Abbildung 2.14 A). Das für *in vitro* Transkription verwendete SN34-1-Fragment besaß eine TTAT→GGAG-Transversion (-287 bis -284) und das SN34-2-Fragment eine CCA→GGC-Substitution im Bereich von -262 bis -260 (Abbildung 2.14 B).

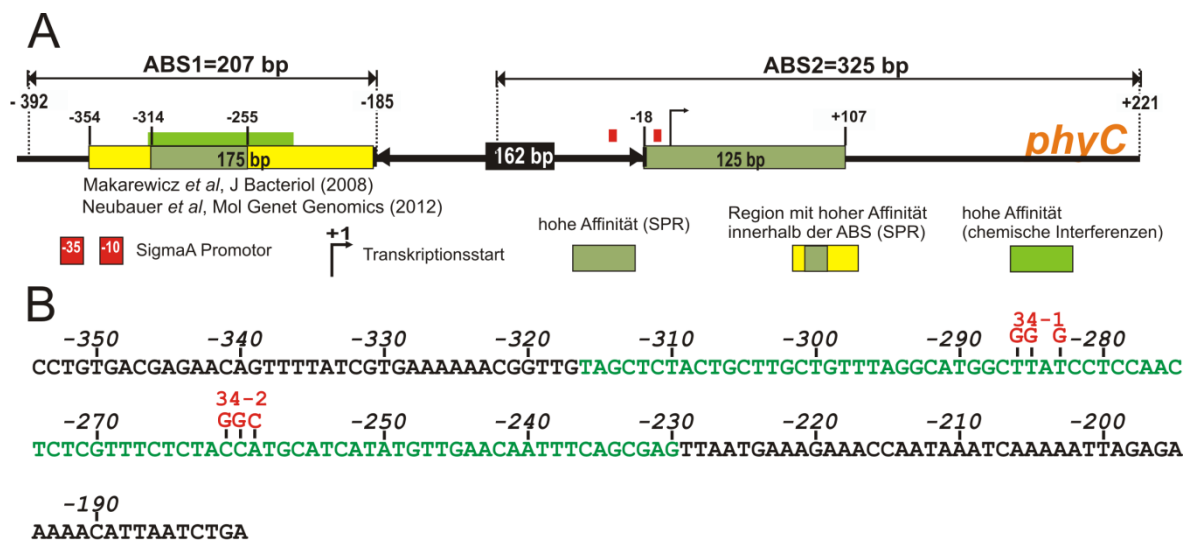


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung der *phyC*-Bereiche, die für *in vitro* Transkriptionsanalysen mit AbrB verwendet wurden.

(A) ABS2 war das PCR-Produkt von F2for und Om09 und wurde als DNA-Template benutzt. ABS1 war das PCR-Produkt von Sn4 und Sn3 und wurde für Mutagenese innerhalb der Kernregion verwendet. Die bp-Größe innerhalb der ABS-Boxen verdeutlicht den geschützten Größenbereich, abgeleitet aus DNaseI-Footprinting (Makarewicz *et al.* 2008). Die hochaffine Region innerhalb ABS1 von *phyC* wurde sowohl mit der SPR-Methode als auch mithilfe chemischer Interferenzen festgelegt (Neubauer *et al.* 2012). (B) Die Nukleotidsequenz der hochaffinen Kernregion innerhalb ABS1, die aus den chemischen Interferenz-Footprintassays abgeleitet wurde (grün), zeigt zwei substituierte DNA-Bereiche: SN34-1 mit einer TTAT→GGAG-Transversion (-287 bis -284) und SN34-2 mit einer CCA→GGC-Substitution (-262 bis -260).

Diese substituierten ABS1-Fragmente wurden in steigenden Mengen in An- und Abwesenheit von AbrB bei der *in vitro* Transkription zugesetzt. Interessanterweise nahm die Intensität der Transkriptmenge mit steigender Konzentration des wt-ABS1-Fragments (SN34-wt, Abbildung 2.15 B) ohne AbrB ab. Der hemmende Effekt wurde durch die AbrB-Zugabe verstärkt (Abbildung 2.15 A). Bei einer ABS1-Konzentration von 0,5 nM und einer konstanten AbrB-Konzentration von 0,65 µM war die Transkription von 10 nM Template

ausreichend gehemmt. Im Gegensatz zum wt-ABS1 zeigten die substituierten ABS1-Fragmente, weder in Ab- noch in Anwesenheit von AbrB, keinen Einfluss auf die Transkription.

Die reduzierten Signale der *in vitro* Transkription, die in Anwesenheit des freien ABS1-Fragments und ohne die Zugabe des Repressorproteins AbrB sichtbar waren, könnten auf eine komplexe Strukturausbildung zwischen der Promotor-DNA und der Kernregion von ABS1 hinweisen. Die Substitutionen innerhalb der Kernregion hatten die hemmenden Effekte aufgehoben und die Transkription wiederhergestellt.

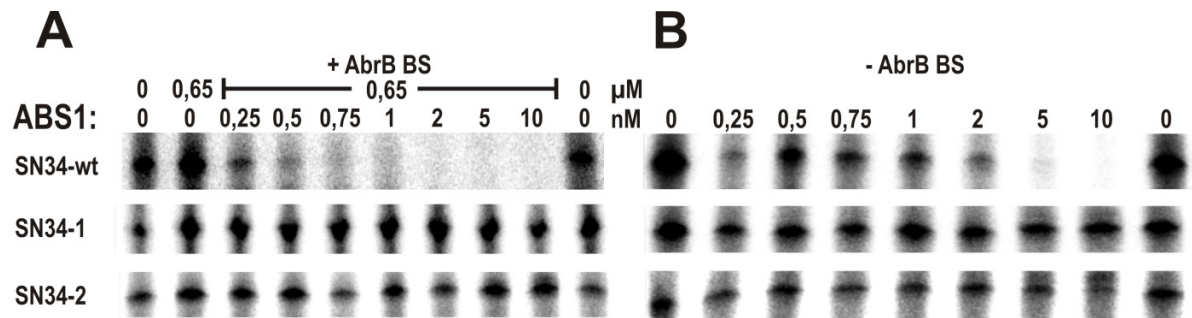


Abbildung 2.15: *In vitro* Transkription von *phyC*.

In Abwesenheit (B) oder Anwesenheit (A) von AbrB aus *B. subtilis* einer konstanten Konzentration von 650 nM und bei steigender ABS1-Konzentration (0 bis 10 nM). Als DNA-Template wurde ABS2-Fragment (F2for/Om09-PCR-Produkt) benutzt, das die *phyC*-Promotorregion und einen kodierenden Bereich des *phyC*-Gens umfasste (Makarewicz *et al.* 2008). Die Assays erfolgten mit 10 nM DNA-Template, 10 nM RNAP und 125 nM PhoP~P in 20 μ l Volumen im Transkriptionspuffer. ABS1-Fragmente wurden mit den Primern Sn4 und Sn3 aus der chromosomalen DNA von *B. amyloliquefaciens* FZB45 (SN34-wt als PCR-Produkt) und den substituierten Plasmiden pSN34-1 und pSN34-2 (SN34-1 bzw. SN34-2 als PCR-Produkte) amplifiziert.

2.2.3 Substitutionsanalysen der C-terminalen Domäne von AbrB

Einer der Schwerpunkte dieser Arbeit lag unter anderem auf der Untersuchung der Rolle der C-terminalen Domäne für die DNA-bindende Aktivität des AbrB-Tetramers. Dazu wurde eine gezielte Alanin-Mutagenese des C-Terminus durchgeführt. Bekanntlich wird der Alanin-Rest für solche Substitutionsanalysen bevorzugt verwendet, da Alanin sowohl eine kleine als auch eine unpolare Aminosäure darstellt. Darüber hinaus besitzt Alanin eine kurze Seitenkette, die für die meisten Interaktionen mit den DNA-Basen ungünstig ist (Luscombe *et al.* 2001). Es wurden die Analysen zur Polymerisierungsform der einzelnen AbrB-Substitutionsvarianten und zu deren Bindungsaktivitäten an zwei unterschiedlichen Ziel-DNAs, die verschiedene Eigenschaften der AbrB-Bindungsstellen (ABS) widerspiegeln (Abbildung 1.3), durchgeführt. Für die Bindungsassays wurden sowohl das große *phyC*-Promotorfragment (440 bp), das beide Bindungsstellen ABS1 und ABS2 (Makarewicz *et al.* 2008) enthält, als auch die bekannte AbrB-Bindungsstelle (~25 bp) des *sinIR*-Promotors P1 verwendet (Shafikhani *et al.* 2002).

2.2.3.1 Selektion von Aminosäuren zur Substitution

Nach Luscombe *et al.* (2001) unterliegen die Protein-DNA-Interaktionen einigen allgemeingültigen Regeln. Dabei sind Arginine (R) und Lysine (K), aber auch Glutamine und Asparagine, von wichtiger Bedeutung bei der Interaktion sowohl mit den DNA-Basen als auch mit dem DNA-Phosphatrückgrat. Auch Aspartat (D) und Glutamat (E) sind dafür bekannt mit den DNA-Basen komplexe Interaktionen einzugehen. Diese AS können je nach Wechselwirkungen entweder zur Spezifität oder zur Stabilität der Bindung beitragen (Luscombe *et al.* 2001). Der Aminosäure-Sequenzvergleich (ClustalW) der AbrB-ähnlichen Proteine aus den unterschiedlichen *Bacillus*-verwandten Arten (Abbildung 1.5), einschließlich des AbrB-paralogen Proteins Abh aus *B. subtilis*, zeigte einen hoch konservierten N-Terminus und einen stärker abweichenden C-Terminus. Die polaren oder geladenen Aminosäure-Reste der C-terminalen Domäne wurden für den Alanin-Austausch ausgewählt. Dazu gehören die hoch konservierten (Sequenzidentität > 80 % bei D62, E77, E85, Q87), die mäßig konservierten (Sequenzidentität > 65 % bei Q55, E80) und weniger konservierten Aminosäure-Reste (Sequenzidentität > 42 % bei K76, Q81, N88, Q89 und Q91).

Die kleinen (G58, G70, G78), hydrophoben (L74, A79) und hydrophilen (C54, T57, E59, N64, S75) Aminosäuren, die innerhalb der AbrB-ähnlichen Proteine komplett konserviert (100 % Sequenzidentität) sind, wurden nicht substituiert, da sie die richtige Konformation des Polypeptidgerüsts bestimmen könnten. Innerhalb des C-Terminus waren die stark konservierten Lysine K71 (100 %) und K94 (> 80 %) von großem Interesse, da diese als mögliche Kontaktstellen zur DNA in Betracht gezogen wurden und deshalb ebenfalls substituiert. Der Aminosäure-Rest K94 liegt bei den meisten AbrB-ähnlichen Proteinen am Ende des C-Terminus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden so insgesamt 14 Alanin-substituierte Mutanten von AbrB konstruiert. Zusätzlich wurde der komplett konservierte Argininrest R15A (100 % Sequenzidentität) in der N-terminalen Domäne ausgetauscht, der laut vorhandener Literatur (Sullivan *et al.* 2008) in DNA-Interaktionen involviert ist. Außerdem wurden zwei der polaren Glutamin-Reste zu den negativ geladenen (sauren) Glutamat-Resten (Q55E und Q81E) und ein polarer Asparaginrest zu einem negativ geladenen Aspartat (N88D) ausgetauscht. Zusätzlich wurde die natürlich vorkommende Substitution Q81K, die dem AbrB aus *B. amyloliquefaciens* entspricht, für die Analysen eingesetzt. Schließlich wurde der hoch konservierte Lysin-Rest, der bei den meisten *Bacillus*-verwandten Arten die letzte Aminosäure darstellt, durch die große und hydrophobe Aminosäure Isoleucin (K94I) ausgetauscht.

2.2.3.2 Polymerisierungsformen der substituierten AbrB-Proteine

Da die C-terminale Domäne an der Tetramerisierung von AbrB beteiligt ist, sollte zunächst geprüft werden, welchen Einfluß die Substitutionen auf die Tertiärstruktur des AbrB-Proteins ausübten. Mittels analytischer Gelfiltration (Methoden 5.3.2.3) wurden die molekularen Massen und die daraus resultierenden polymeren Zustände der AbrB-Varianten bestimmt. Die Häufigkeiten der einzelnen polymeren Formen wurden prozentual, resultierend aus dem Peak-Flächeninhalt der Chromatogramme, berechnet und dargestellt (Abbildung 2.17; Tabelle 7.7). Die meisten AbrB-Varianten (WT-AbrB, Q55A, D62A, K71A, E77A, E80A, Q81A, N88A, N88D, Q89A) zeigten eine erhöhte Schulter, die sich über den Bereich der höheren Polymerordnung erstreckte, und einen maximalen Peak, der einer tetrameren Form entsprach (Abbildung 2.16 A-D). Der höchste Schulterbereich entsprach der oktameren Form ($n \sim 8$). Die AbrB-Mutanten R15A, Q55E und K94I zeigten zusätzlich zu dem tetrameren Peakmaximum einen deutlichen Peak bei hohen polymeren Formen. Die AbrB-Mutanten Q81E und E85A wiesen ein Plateau bei niedrigen Retentionsvolumina auf. Eine deutlich flach nach unten verlaufende Kurve in dem Bereich hoher Polymere wurde bei K76A, Q81K, Q87A, Q91A und K94A beobachtet.

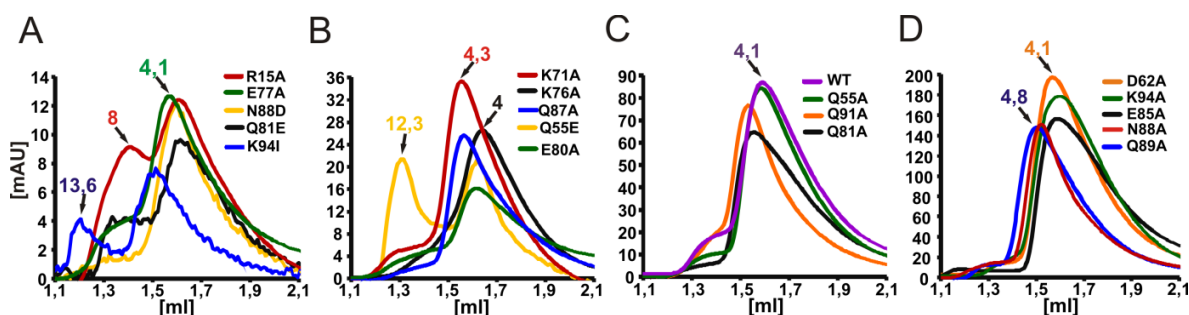


Abbildung 2.16: Analytische Gelfiltration der AbrB-Varianten aus *B. subtilis* 168 zur Bestimmung der molekularen Masse und der daraus resultierenden polymeren Formen (Pfeil).

(A-D) Die Chromatogramme der AbrB-Varianten zeigen eine graphische Auftragung der Absorption [mAU] gegen das Retentionsvolumen [ml] der mobilen Phase.

Das AbrB-WT-Protein aus *B. subtilis* 168 wies zusätzlich zu den tetrameren Formen (87 %) auch anteilmäßig 13 % an Octameren auf. Die natürlich vorkommende AbrB-Mutante Q81K, die dem WT-AbrB aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 entspricht, so wie auch die Mutante K76A, eluierten mit beinahe 100 % an Tetrameren. Die meisten der Alanin-Substitutionen innerhalb des C-Terminus verursachten keine signifikanten Veränderungen des tetrameren Zustandes. Diese wiesen einen Anteil an Tetrameren auf, der dem WT-AbrB entsprach (K71A und Q91A mit 85-87 %) oder sogar etwas höher lag (Q55A, D62A, Q81A, E85A, Q87A, N88A, Q89A, Q91A, K94A und N88D mit 91-98 %).

Eine besonders signifikante Abweichung in der Verteilung der polymeren Formen zeigten die Alanin-Mutanten R15A, E77A, E80A und die Nicht-Alanin-Mutanten Q55E, Q81E, K94I. Dabei führten die Alanin-Substitutionen am E77- und E80-Rest zu einer Zunahme an octameren Formen bis auf 17 bzw. 22 %. Die Substitution innerhalb des N-Terminus (R15A) verursachte eine Zunahme der octameren Form bis auf 42,5 %. Die Nicht-Alanin-Substitution der Position Q81 zum Glutamat (E) führte zu einem Anteil an Octameren von 22 % und die vom Q55-Rest zum Glutamat (E) erzeugte einen Anteil von mehr als 50 % an Dodecameren ($n \sim 12$). Der Austausch von K94, der letzten AS im Protein, zum Isoleucin (I) verursachte eine Zunahme in Richtung der höheren polymeren Formen ($n \sim 14$) bis zu 30 %.

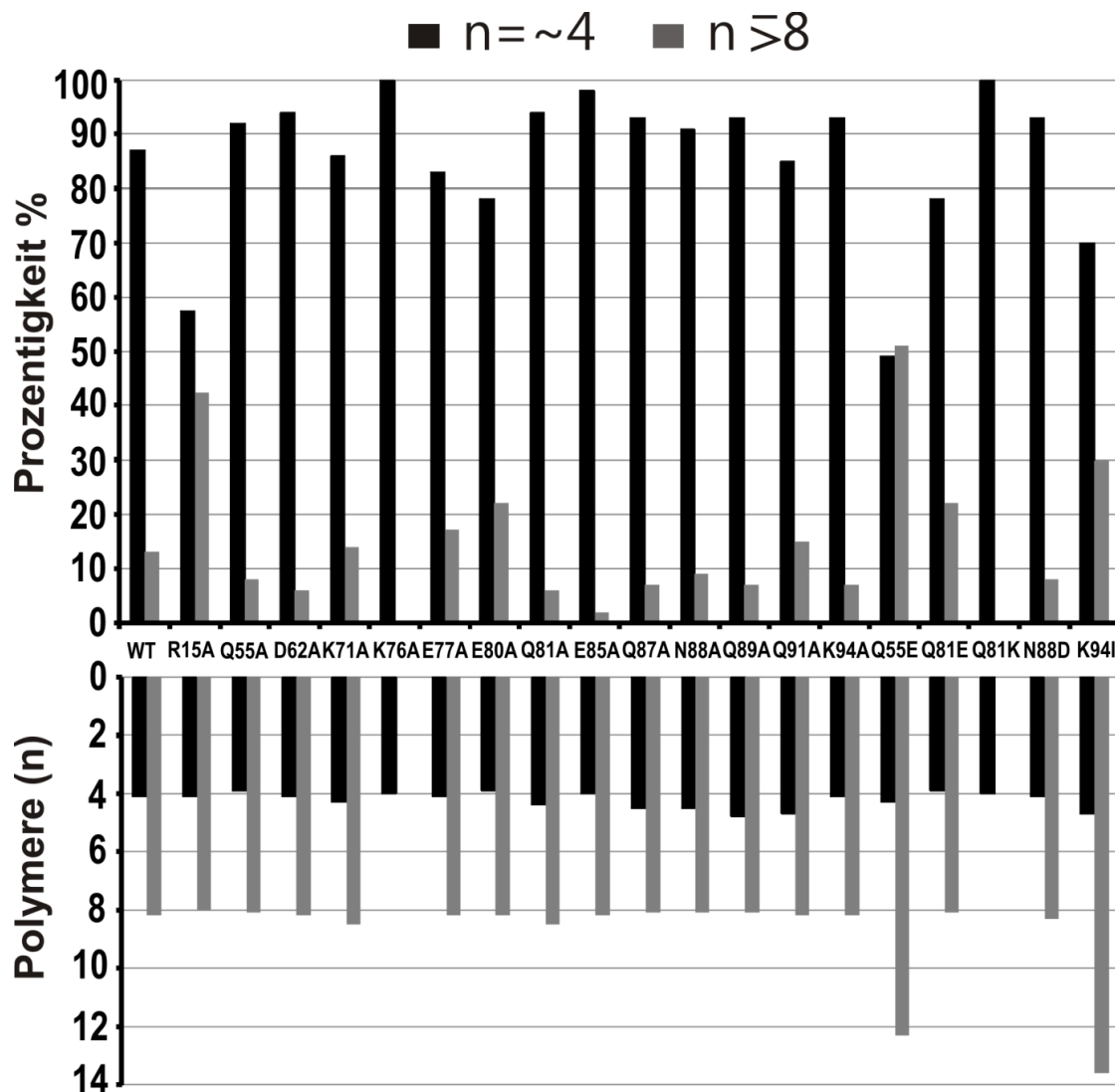


Abbildung 2.17: Darstellung der polymeren Formen der AbrB-Varianten.

Oberer Teil des Balkendiagramms zeigt die Häufigkeit (in %) der auftretenden polymeren Formen zu jeder AbrB-Variante. Die prozentuale Quantität der Tetramere wird durch schwarze Balken und der höheren Polymere ($n \geq 8$) durch graue Balken dargestellt. Der untere Teil des Balkendiagramms (spiegelverkehrt) stellt die unterschiedlich auftretenden polymeren Formen (n) zu jedem AbrB-Protein dar. Die polymere Formen (n) wurden unter Berücksichtigung der molekularen Masse jeder einzelnen AbrB-Variante berechnet (Tabelle 7.2). Die molekularen Massen mit ihren Standardabweichungen, der %-Häufigkeit und den polymeren Formen (n) zu jeder AbrB-Variante sind in der Tabelle 7.7 zusammengefasst.

2.2.3.3 Bindungsassays der AbrB-Derivate mit dem *phyC*-Promotor

Die Gelretardationsassays wurden mit dem 440 bp großen *phyC*-Promotorfragment (FFL3), das beide Bindungsstellen ABS1 und ABS2 umfasst, durchgeführt. Die Positionen und die Größe (bp) des *phyC*-Fragments sind in der Abbildung 2.18 dargestellt.

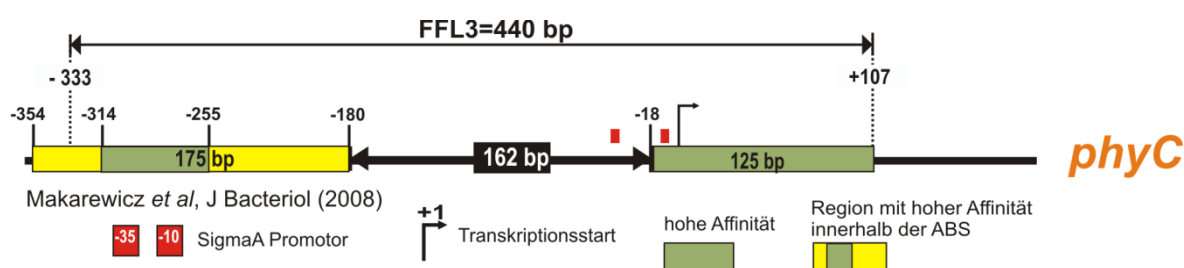


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung des ^{32}P -markierten *phyC*-Promotorfragments FFL3.

Das Fragment FFL3 (PCR-Produkt von Sn5 und Sn6; FFL = DNA-Fragment *full-length*) wurde für die Bindungsassays mit AbrB-Varianten verwendet. Die unterschiedliche Affinität von AbrB zu den AbrB-Bindungsstellen und die hochaffine Region innerhalb der ABS1 von *phyC* wurden mittels der SPR-Methode abgeleitet und sind durch unterschiedliche Farben verdeutlicht. Die bp-Größe innerhalb der ABS-Boxen verdeutlicht den geschützten Größenbereich, der mittels DNaseI-Footprinting abgeleitet wurde.

Die Alanin-Substitutionen innerhalb der C-terminalen Domäne von AbrB beeinflussten stark die Bindungsfähigkeit von AbrB an die *phyC*-Region (Abbildung 2.19). Sowohl WT-AbrB aus *B. subtilis* als auch die AbrB-Variante Q81K, die dem AbrB aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 entspricht, shifteten die *phyC*-DNA-FFL3 ab einer Konzentration von 0,5 μM und zeigten Schmierbanden bis zu 1,5 μM AbrB. Diese Schmierbanden waren ein Hinweis auf die Ausbildung von Zwischenformen der AbrB-DNA-Komplexe (Strauch 1995c, Hamoen *et al.* 2003, Makarewicz *et al.* 2008). Ab 2 μM AbrB wurde ein starker Shift (Supershift) beobachtet, der auf einen stabilen, großen Komplex hindeutete (Abbildung 2.19). Die meisten Alanin-Substitutionen von polaren oder geladenen Resten innerhalb des C-Terminus, die ähnlich dem WT-AbrB größtenteils als Tetramere vorlagen, resultierten in einer stark reduzierten oder fehlenden DNA-Bindungsaktivität. Die Mutanten Q55A, K76A, E77A, N88A und Q89A zeigten erst ab 2 μM oder 3 μM AbrB eine Bindung an *phyC*. Die AbrB-Varianten D62A, Q81A, Q87A und Q91A shifteten *phyC* erst ab 6 μM AbrB. Durch die Alanin-Substitutionen an Positionen K71A,

E80A, E85A und K94A wurde die Fähigkeit von AbrB, an die *phyC*-DNA zu binden, komplett aufgehoben.

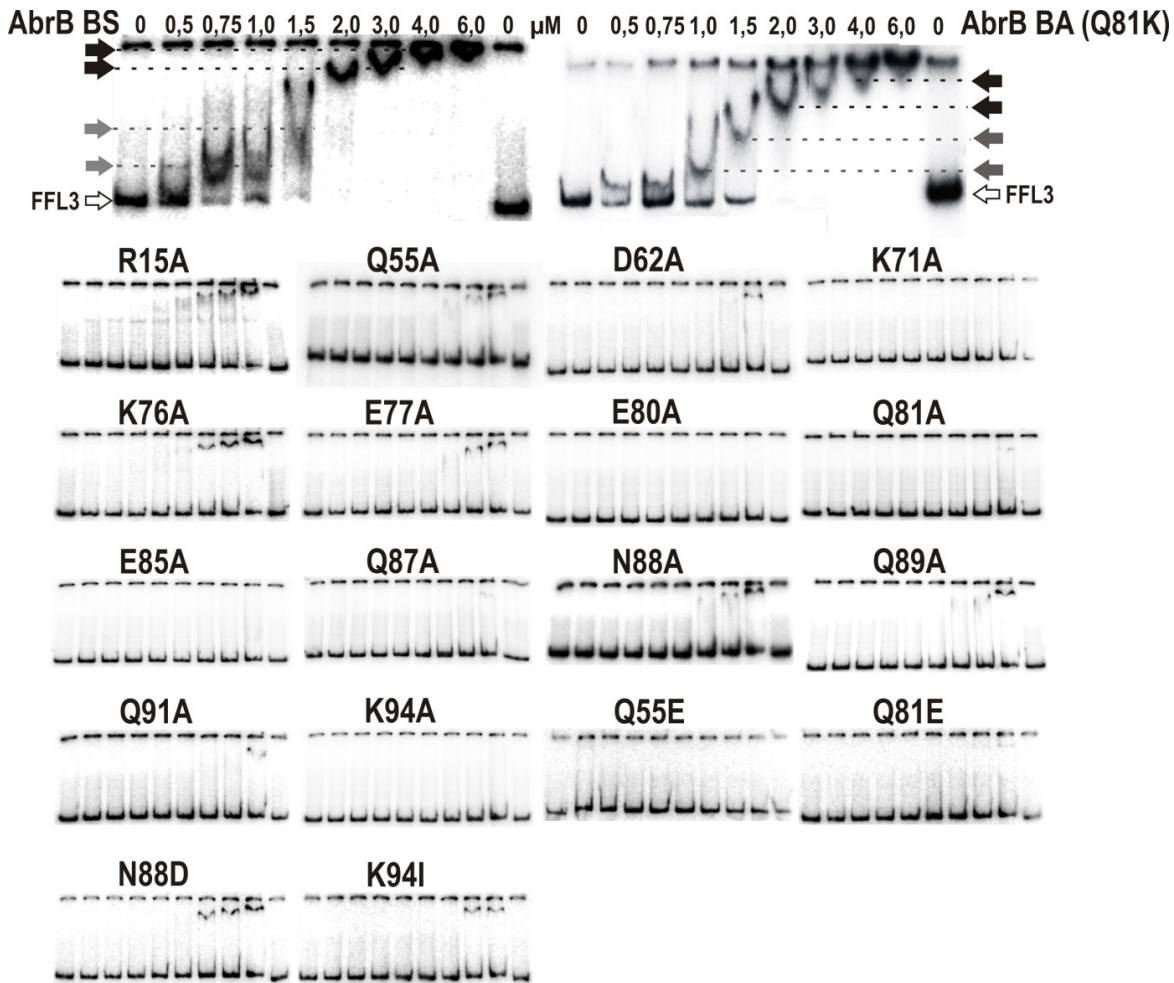


Abbildung 2.19: Gelretardationsassays von unterschiedlichen AbrB-Mutanten mit ^{32}P -markiertem full-length DNA-Fragment FFL3 des *phyC*-Promotors.

Das FFL3 von 1,14 nM (10000 cpm) wurde mit steigenden Konzentrationen an AbrB inkubiert: 0 μM , 0,5 μM , 0,75 μM , 1 μM , 1,5 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 6 μM und 0 μM . Die AS-Substitutionen sind jeweils oberhalb des Gels dargestellt. AbrB BS aus dem *B. subtilis* 168 ist das WT-AbrB. Das pABRB-Plasmid diente als Ausgangsplasmid für die Mutagenese der C-terminalen Domäne des AbrB-Proteins. AbrB BA ist das Protein aus *B. amyloliquefaciens* FZB45. Die weißen Pfeile zeigen die freie DNA (FFL3), die schwarzen Pfeile den stabilen DNA-Protein-Komplex, die grauen Pfeile den instabilen DNA-Protein-Komplex.

Die Alaninsubstitution an der Position R15 verursachte zwar eine Instabilität des Tetramers und somit eine Zunahme an octameren Formen, jedoch war die R15A-Mutante immer noch fähig die *phyC*-DNA zu shiften. Um die Bindungsaffinitäten der R15A-Mutante und des WT-AbrB zu vergleichen, wurden die apparenten Dissoziationskonstanten K_{app} aus den Intensitäten der freien DNA-Banden und der durch AbrB gebundenen DNA-Banden mithilfe der QuantityOne 4.5.1 Software (Biorad) abgeleitet (Abbildung 7.18) und in einer linearen Auftragung von $\log[(\text{DNA}_{\text{gebunden}})/(\text{DNA}_{\text{ungebunden}})]$ gegen $\log[\text{AbrB}_4]$ dargestellt.

Dabei lieferte die Umkehrfunktion des dekadischen Logarithmus aus dem Abszissenabschnitt den K_{app} -Wert.

So wurde ein K_{app} -Wert für die R15A-Mutante mit $3,4 \times 10^{-6}$ M und für WT-AbrB mit $0,66 \times 10^{-6}$ M bestimmt. Wenn man bedenkt, dass die Menge an tetrameren Formen von AbrB R15A im Vergleich zum WT-AbrB (87 %) nur 57,6 % betrug, erscheint die Reduktion der Affinität durch die R15A Substitution relativ schwach im Vergleich zum WT-AbrB. Die hier ermittelten K_{app} -Werte sind nur Näherungswerte und sollten verdeutlichen, dass die R15A-Substitution eine geringere Auswirkung auf die DNA-Bindung hat als bis lang anhand von Strukturdaten angenommen wurde (Sullivan *et al.* 2008). Laut der hier vorgestellten Ergebnisse scheint der R15-Rest weniger an der DNA-Bindung beteiligt zu sein und viel mehr seine Funktion in der Tetramerisierung zu haben.

Während die Alanin-Substitution von Q55 zu reduzierter DNA-Bindungsaktivität führte, hat der Austausch zum negativ geladenen Glutamat-Rest (Q55E) die Bindungsaktivität der Mutante komplett aufgehoben. AbrBQ81E verlor auch die Fähigkeit die *phyC*-DNA zu binden. Interessanterweise zeigte die natürlich vorkommende AbrB-Variante Q81K, die an Position 81 einen positiv geladenen Lysin-Rest anstelle des polaren, ungeladenen Glutamin-Restes besitzt, ein ähnliches Bindungsverhalten, wie das AbrB-Protein aus *B. subtilis* (Abbildung 2.19) (Makarewicz *et al.* 2008). Aus diesem Grund war ein negativer Rest an Position 81 für die DNA-AbrB-Interaktionen unvorteilhaft.

Der Austausch von N88 durch Alanin- oder Aspartat-Reste führte zu vergleichbaren Veränderungen in der Bindungsfähigkeit der Proteinvarianten. Beide zeigten zwar eine reduzierte Bindungsaktivität, waren jedoch immer noch fähig die *phyC*-DNA zu binden. Somit hatten weder eine veränderte Größe (N88A) noch die Ladung (N88D) an der N88-Position eine starke Auswirkung auf die *phyC*-AbrB-Interaktionen.

Die Ergebnisse der nativen Gelretardationsassays zeigten deutlich, dass die C-terminale Domäne die DNA-bindende Aktivität von AbrB beeinflusst.

2.2.3.4 Bindungsassays der AbrB-Derivate mit dem *sinIR*-Promotor

Für die Analyse der Bindungsaktivitäten einzelner AbrB-Varianten wurde zusätzlich die bekannte AbrB-Bindungsstelle des *sinIR*-Promotors P1 verwendet (Abbildung 2.20). Die *sinIR*-ABS weist, im Gegensatz zur *phyC*-Promotorregion (Abbildung 2.18), einen anderen AbrB-Bindungscharakter auf. Denn die Footprinting-Analysen zeigten, dass AbrB einen sehr kurzen DNA-Bereich von nur 24 bp abdeckte (Shafikhani *et al.* 2002). Shafikhani *et al.* (2004) zeigten, dass eine direkte AbrB-Bindung nahe dem P1 Promotor des *sinIR*-Operons in Verbindung mit der negativen Kontrolle durch AbrB steht. Die weiteren *transition-state* Regulatoren Hpr und Spo0A~P aus *B. subtilis* binden auch an die P1-

Promorregion und beeinflussen die *sinIR*-Expression, indem eine reprimierende Kontrolle von *sinIR* durch Hpr und aktivierende durch Spo0A~P erfolgt (Shafikhani *et al.* 2002).

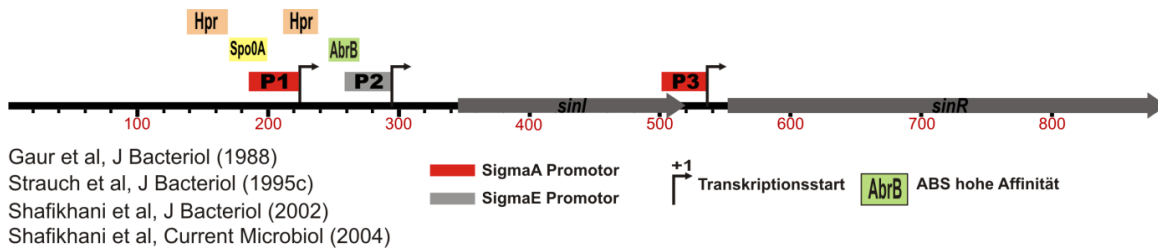


Abbildung 2.20: Schematische Darstellung des dicistronischen *sinIR*-Operons und der regulatorischen Bindungsstellen der P1-Promotorregion.

Das ^{32}P -markierte, 36 bp große DNA-Fragment des *sinIR*-Promotors P1 (+20 bis +55) wurde für Bindungsassays mit AbrB-Varianten verwendet. Die weiteren dargestellten Bindungsstellen (für Hpr und Spo0A~P) der P1-Promorregion wurden anhand DNaseI-Footprinting abgeleitet (Shafikhani *et al.* 2002). Der Spo0A~P- abhängige P1-Promotor wird während der vegetativen Wachstumsphase reprimiert und zu Beginn der stationären Phase aktiviert. Die Produkte des *sinIR*-Operons, SinI und SinR, weisen je nach Wachstumsphase unterschiedliche Mengen auf. Die bp-Zahlenwerte (~900 bp lang) verdeutlichen die maßstabgerechte bp-Einteilung (DS Gene 1.5 Programm).

Die Bindungsassays mit *sinIR*-DNA wurden nur mit den AbrB-Varianten durchgeführt, die mit *phyC*-DNA eine Bindung zeigten. Substitutionsvarianten, die bei der *phyC*-DNA die Bindungsaktivität komplett verloren haben, wurden nicht berücksichtigt, da hier davon ausgegangen wurde, dass diese Mutanten keine DNA-Bindungsaktivität mehr hatten. Die getesteten AbrB-Mutanten zeigten allerdings keine Bindungsaktivität gegenüber der AbrB-Bindungsstelle des *sinIR*-Promotors. Das 36 bp lange ds-Oligonukleotid, das nur über eine AbrB-Erkennungsstelle von 24 bp verfügt, wurde durch WT-AbrB (AbrB aus *B. subtilis*) ab einer Konzentration von 0,25 μM ohne Ausbildung von Zwischenformen und ohne erkennbaren Supershift gebunden (Abbildung 2.21). Die substituierten Proteine waren jedoch unfähig das *sinIR*-DNA-Fragment zu shiften (Abbildung 2.21; Abbildung 7.17).

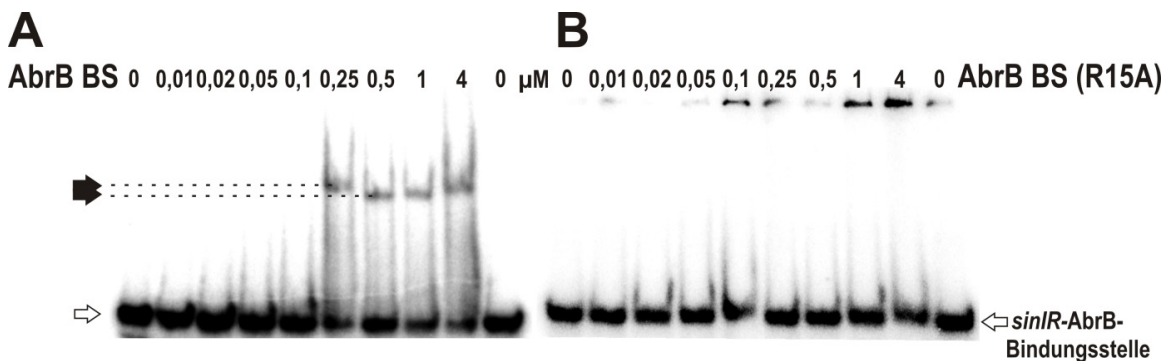


Abbildung 2.21: Gelretardationsassays von unterschiedlichen AbrB-Mutanten mit ^{32}P -markierter ABS des *sinIR*-Promotors P1.

Das ^{32}P -markierte, 36 bp große DNA-Fragment des *sinIR*-Promotors P1 von 0,95 nM (10000 cpm) war mit AbrB aus dem *B. subtilis* 168 in steigenden Konzentrationen inkubiert: 0 μM , 0,01 μM , 0,02 μM , 0,05 μM , 0,1 μM , 0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM , 4 μM und 0 μM .

2.2.4 AbrB-AbbA-Wechselwirkung und Einfluss auf die DNA-Bindung

2.2.4.1 Native Gele zur Analyse der AbrB-AbbA-Interaktionen

In dieser Arbeit wurde die Komplexbildung der AbrB-Varianten mit seinem Antirepressor AbbA mittels nativer, horizontaler Agarose-Gelelektrophorese untersucht (Methode, Kapitel 5.3.3.2). Die Proteine wurden in einem nativen Gel in 1 x TG-Laufpuffer (pH 8,8) nach ihrer Größe und ihrer Eigenladung getrennt. Die Proteine AbrB und AbrBN wiesen einen hohen isoelektrischen Punkt (IEP 8,3 bei AbrB BS, IEP 8,9 bei AbrB BA und IEP 9,3 bei AbrBN) auf. Die IEPs vom AbbA BS mit 6,24 und vom AbbA BA mit 6,15 waren niedriger (IEPs mit DS-Gene 1.5 Software ermittelt). Weswegen zu erwarten war, dass die Proteine und Proteinkomplexe, auf Grund der resultierenden IEPs, unter den Elektrophoresebedingungen zu unterschiedlichen Elektroden laufen werden. Deshalb wurden die Gele in der Mitte beladen, so dass die Reaktionspartner und Komplexe in beide Richtungen laufen konnten.

Die jeweiligen AbrB- und AbbA-Proteine wurden einzeln und in Proteinkomplexen analysiert, wobei durch die steigende AbbA- bzw. AbrB-Konzentration unterschiedliche Bindungsverhältnisse hergestellt wurden. Wie erwartet, zeigten die freien AbrB-Proteine ein unterschiedliches Laufverhalten: während AbrB BS langsam zu Anode (+) gelaufen ist, blieb AbrB BA im Bereich um die Beladungstasche konzentriert. Das verkürzte AbrB (AbrBN) bewegte sich zur Kathode (-) und die beiden AbbA-Proteine zur Anode.

Die Bindungsassays erfolgten unter den konstanten AbrB-Konzentrationen (10 μM AbrB und 15 μM AbrBN), unter den steigenden AbbA-Konzentrationen (5 μM , 10 μM und 20 μM / 7,5 μM , 15 μM und 30 μM) und umgekehrt (Abbildung 2.22 A bis C). Eine konzentrationsabhängige Komplexbildung konnte dabei deutlich beobachtet werden (Abbildung 2.22 A bis B; schwarze Pfeile). Das Laufverhalten von AbrB in Gegenwart von AbbA wurde deutlich verändert und zeigte eine stabile Komplexbildung ohne sichtbare Schmierbande. Interessanterweise, war eine freie AbrB-Bande bei den Konzentrationen von 5 μM AbrB-Tetramer und 5 μM AbbA-Dimer (Verhältnis von 1 AbrB_4 :1 AbbA_2) sichtbar (Abbildung 2.22 A und B) und wies damit auf eine Sättigung mit AbbA hin. Auch umgekehrt wurde ein ähnlicher Effekt beobachtet. Eine freie Bande von AbbA wurde bei den Konzentrationen von 5 μM AbbA-Dimer BS bzw. 10 μM AbbA-Dimer BA und 2,5 μM AbrB-Tetramer beobachtet (Verhältnis von 1 AbrB_4 :2 AbbA_2 bzw. 1 AbrB_4 :4 AbbA_2). Eine eher schwache Komplexbildung wurde hingegen zwischen dem AbbA BS und dem AbrBN beobachtet: hier zeigte AbrBN bei höheren AbbA-Konzentrationen eine leichte Veränderung im Laufverhalten, wobei die AbrBN Bande dichter aber schwächer zur Kathode wanderte.

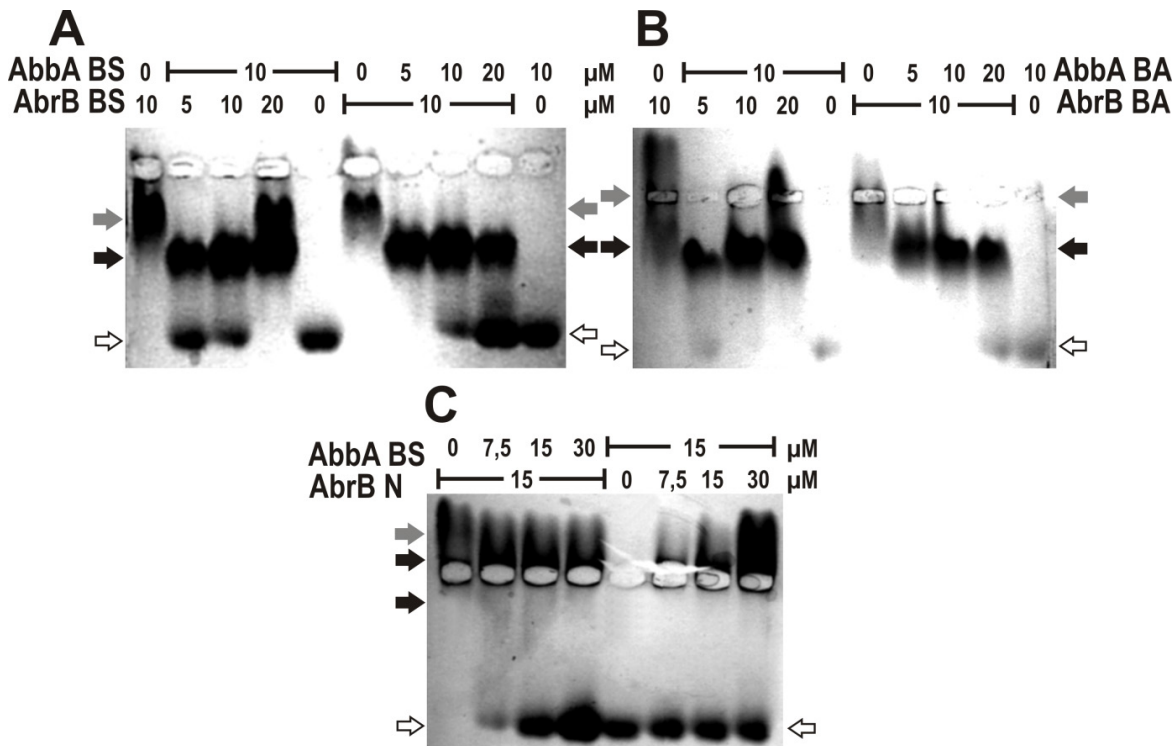


Abbildung 2.22: Native Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis der Komplexbildung zwischen AbrB und AbbA.

AbbA-Proteine aus *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens* wurden in unterschiedlichen Verhältnissen mit AbrB-Varianten inkubiert. Der Gellauf erfolgte bei RT für 90 min bei der Spannung von 70 Volt. Die trockenen Agarose-Gele wurden anschließend mit Page Blue Protein Staining Solution (Fermentas) gefärbt.

Zusätzlich wurde die Komplexbildung zwischen dem AbbA BS und den AbrB-Mutanten R15A und K76A untersucht. Der Arginin-Rest an der Position 15 liegt im zentralen β_2/β_2' -Faltblattpaar der DNA-bindenden Oberfläche der N-terminalen Domäne und wurde für die DNA-Bindungsaktivität von AbrB mit verantwortlich gemacht (Sullivan *et al.* 2008). Die R15A-Mutante, die zwar eine Instabilität des Tetramers zufolge hatte, zeigte in dieser Arbeit eine geringe Auswirkung auf die DNA-Bindung (Kapitel 2.2.3.3). Allerdings hatte diese Mutante keinen Komplex mit dem Antirepressor AbbA gebildet (Abbildung 2.23 B). Dies deutet darauf hin, dass der R15-Rest die Interaktion zwischen dem AbrB und AbbA stark beeinflusst. Die Substitution K76A innerhalb der C-terminalen Domäne, die eine reduzierte Bindung von AbrBK76A an *phyC*-Promotorregion verursachte, zeigte ein verändertes Laufverhalten in Gegenwart von AbbA. AbrBK76A und AbbA bildeten zusammen einen instabilen Komplex, der durch stark schmierende Banden deutlich wurde (Abbildung 2.23 A).

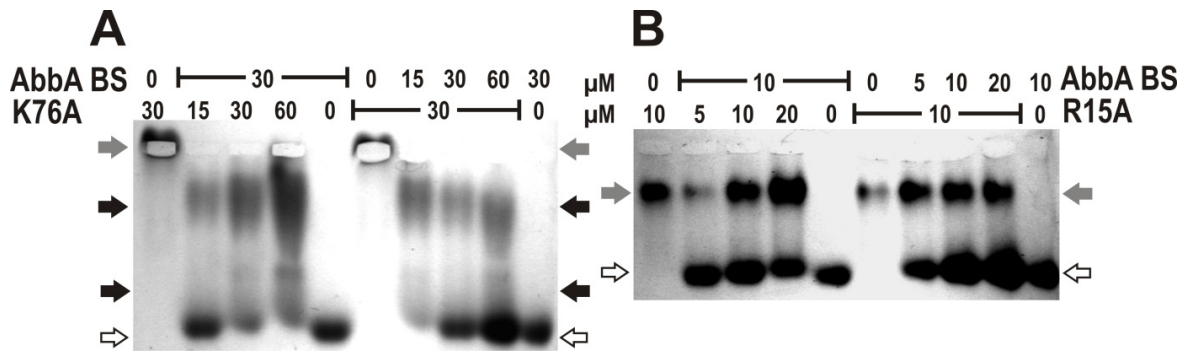


Abbildung 2.23: Native Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis der Komplexbildung zwischen den AbrB-Varianten und AbbA aus *B. subtilis*.

Das AbbA-Protein wurde in unterschiedlichen Verhältnissen mit entsprechenden AbrB-Varianten betrachtet. Die R15A-Substitution erfolgte innerhalb der N-terminalen DNA-bindenden Domäne, während die K76A-Substitution im C-Terminus von AbrB lag.

2.2.4.2 AbbA hemmt die Bindung von AbrB an den *phyC*-Promotor

Die Gelretardationsassays mit AbrB und seinem Antirepressor AbbA wurden unter Verwendung von einem radioaktiv markierten *phyC*-Promotorfragment FFL3 durchgeführt. Die Position und die Größe (bp) des *phyC*-Fragments sind in der Abbildung 2.18 dargestellt.

Laut Literatur hemmt AbbA die AbrB-Bindung an vier unterschiedlichen Promotoren *sdp*, *skf*, *lip* und *comK* (Banse *et al.* 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkung der Antirepressor AbbA BS bzw. AbbA BA auf die DNA-bindende Aktivität von AbrB BS bzw. AbrB BA bei der Interaktion mit dem *phyC*-Promotor hat.

Wie bereits in Kapitel 2.2.3.3 gezeigt, waren beide AbrB-Proteine (aus *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens*) in der Lage das große *phyC*-Promotorfragment konzentrationsabhängig zu shiften (Abbildung 2.19). Zur Kontrolle wurde zusätzlich untersucht, ob AbbA an die *phyC*-DNA binden kann. Wie die Abbildung 7.19 verdeutlicht, konnten keine Shifts bis zu AbbA-Konzentration von 4 µM mit dem *phyC*-Promotorfragment nachgewiesen werden, woraus folgt, dass unter den üblichen physiologischen Bedingungen nur das AbrB an die *phyC*-Promotorregion bindet. Die Abbildung 2.24 zeigt die Verdrängungsreaktionen von AbrB, die durch höhere AbbA-Konzentrationen (0,5 bis 6 µM) verursacht wurden. Bei der konstanten Konzentration an AbrB BS von 2 µM wurde unter Zugabe von bis zu 0,5 µM AbbA BS ein stabiler AbrB-DNA-Komplex erhalten, ohne sichtbare freie FFL3-DNA, erkennbar. Ab den AbbA-Konzentrationen über 1 µM wurde AbrB von der DNA unter Ausbildung der Zwischenkomplexe verdrängt, was man durch die zunehmende schmierende Bande beobachten konnte, wobei gleichzeitig die freie DNA-Bande zunehmend stärker wurde. Der Zwischenkomplex war bis zu 4 µM AbbA deutlich zu sehen. Bei AbrB BA war der AbrB-

DNA-Komplex bis zu einer AbbA-Konzentration von 2 μM stabil. Erst ab 3 μM AbbA wurde der AbrB-DNA-Komplex ohne die sichtbare Schmierbande verdrängt.

Interessanterweise zeigten die beiden AbrB-Proteine etwas unterschiedliche Verdrängungseigenschaften durch AbbA von der FFL3-DNA, bei denen der AbrB BA-DNA-Komplex, im Gegensatz zu AbrB BS, zwar erst bei etwas höheren AbbA-Konzentrationen, dafür aber rasch und ohne sichtbare Zwischenformen aufgelöst wurde. Insgesamt war in beiden Fällen mindestens die vierfache Menge an AbbA-Dimer notwendig ($1\text{AbrB}_4:4\text{AbbA}_2$), um den AbrB_4 -DNA-Komplex aufzulösen.

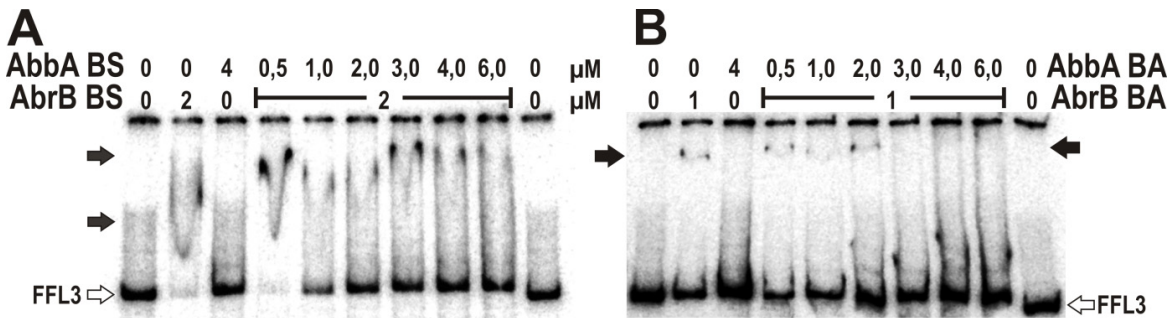


Abbildung 2.24: Gelretardationsassays mit dem ^{32}P -markierten *phyC*-Promotorfragment FFL3 und mit den AbbA- und AbrB-Proteinen aus *B. subtilis* (A) bzw. aus *B. amyloliquefaciens* (B).

Die Verdrängungsreaktionen erfolgten mit der radioaktiv markierten DNA (10000 cpm, 1,14 nM als Endkonzentration) pro Ansatz, der konstanten AbrB-Konzentration und den steigenden AbbA-Konzentrationen [μM]. Die weißen Pfeile zeigen die freie FFL3-DNA und die schwarzen Pfeile den stabilen DNA-Protein-Komplex.

2.3 Zirkulardichroismus-Bindungsstudien

2.3.1 Bindungsuntersuchungen der ds-Oligonukleotide mit AbrB und AbrBN

Zusätzlich zur SPR-Methode wurde die Zirkulardichroismus(CD)-Spektroskopie angewandt, um die Bindungsreaktionen zwischen den AbrB-Proteinen und den einzelnen ds-DNA-Oligonukleotiden zu untersuchen. Die CD-Spektroskopie ermöglichte die Veränderungen der Sekundärstrukturen sowohl von den AbrB-Proteinen, als auch von den Oligonukleotiden, direkt während der Interaktion zu verfolgen.

Bei den quantitativen Analysen der AbrB-Proteine (Kapitel 2.3.2) konnte beobachtet werden, dass die wiederholten CD-Messungen bei den unterschiedlichen Konzentrationen derselben Proteine beinahe identische Spektren lieferten und weder Intensitätsverluste noch Verzerrungen der CD-Spektren aufzeigten. Die ermittelten Sekundärstrukturanteile variierten damit unwesentlich, womit sichergestellt werden konnte, dass die freien AbrB-Proteine über den für die Messungen erforderlichen Zeitraum (ca. 90 Minuten) und bei den gewählten Bedingungen (in 10 mM TrisHCl (pH 7,4), 300 mM NaF, 1 mM bzw. 10 mM DTT, 10 % Glycerin bei konstanten 25°C) stabil blieben und sich dabei keinen

Strukturänderungen unterzogen.

Die CD-Spektren wurden von den einzelnen Bindungspartnern (freie Proteine und freie ds-Oligonukleotide) und von den Protein-DNA-Komplexen bei einem 1:8-Verhältnis (DNA:Protein) aufgenommen. Das CD-Spektrum des Puffers wurde als Referenz von den Spektren der Analyte subtrahiert. Das CD-Spektrum von AbrB zeigte zwei Minimas im fernen UV-Bereich bei ungefähr 208 und 219 nm, die in der Literatur bereits beschrieben wurden (Bobay *et al.* 2004). AbrBN wies nur ein Minimum bei ungefähr 203 nm auf. Um die Veränderungen in der Proteinstruktur festzustellen, wurden die CD-Spektren der freien Oligonukleotide von den Spektren der Komplexe subtrahiert und mit den CD-Spektren der freien Proteine verglichen (Abbildung 2.25). Die DNA-Oligonukleotide der Gruppe I induzierten dabei Konformationsänderungen im AbrB, die durch eine Verringerung der negativen Elliptizität im Wellenbereich zwischen 205 nm und 230 nm messbar waren, während die GII-Oligonukleotide die AbrB-Konformation nicht signifikant beeinflussten. Interessanterweise erzeugten alle ds-Oligonukleotide vergleichbare Veränderungen in den AbrBN-Spektren im Wellenbereich von 200 nm bis 230 nm. Die Ergebnisse der CD-Spektroskopie unterstützen damit das *Two-State*-Bindungsmodell (*conformation change reaction*), das mittels der SPR ermittelt wurde und zeigten ferner, dass die ds-Oligonukleotide der Gruppe I die Konformationsänderung innerhalb des *full-length* AbrB induzierten.

Zusätzlich führten die meisten Oligonukleotide zu Abweichungen in den AbrBN-Spektren im Wellenbereich von 245 nm bis 290 nm (Abbildung 2.25 B und D), die bei AbrB nicht beobachtet wurden. Da gleichzeitig eine Erhöhung der positiven Elliptizität bei ~250 nm von + 260 (D1) bis + 700 (U7) deg cm² dmol⁻¹ und eine Erhöhung der negativen Elliptizität bei 275 nm von – 415 (U3) bis - 923 (U7) deg cm² dmol⁻¹ vorlag, könnte das ein Hinweis auf einen Übergang der Sulfhydrylgruppen von der reduzierten zur oxidierten Form bei AbrBN sein. Diese Art von Disulfidtransitionen wurde bei den Interaktionen des Neurophysin-Hormons beobachtet (Breslow 1970). Das AbrB-Monomer enthält einen einzigen Cystein-Rest an der Position 54. Es ist bekannt, dass die Sulfhydrylgruppen im aktiven AbrB in ihrer reduzierten Form vorliegen und die tetramere Proteinstruktur stabilisieren (Yao *et al.* 2005). Da AbrB solche Transitionen nicht zeigte, spricht es dafür, dass die Sulfhydrylgruppen innerhalb des AbrB-Tetramers bei der DNA-Bindung reduziert bleiben. Im Gegenteil, schienen die meisten DNA-Oligonukleotide eine Oxidation der Sulfhydrylgruppen beim AbrBN-Dimer zu verursachen. Ausgehend von der Annahme, dass die Elliptizität pro Disulfidbrücke bei ~ 250 nm + 2300 deg cm² dmol⁻¹ und bei ~ 275 nm - 2900 deg cm² dmol⁻¹ beträgt (Breslow 1970) und dass ein AbrBN-Dimer eine Disulfidbrücke ausbilden kann (Xu *et al.* 2001, Sullivan *et al.* 2008), muss

folgerichtig angenommen werden, dass 11-32 % der Sulfhydrylgruppen der AbrBN-Dimere in Gegenwart von DNA oxidiert vorlagen.

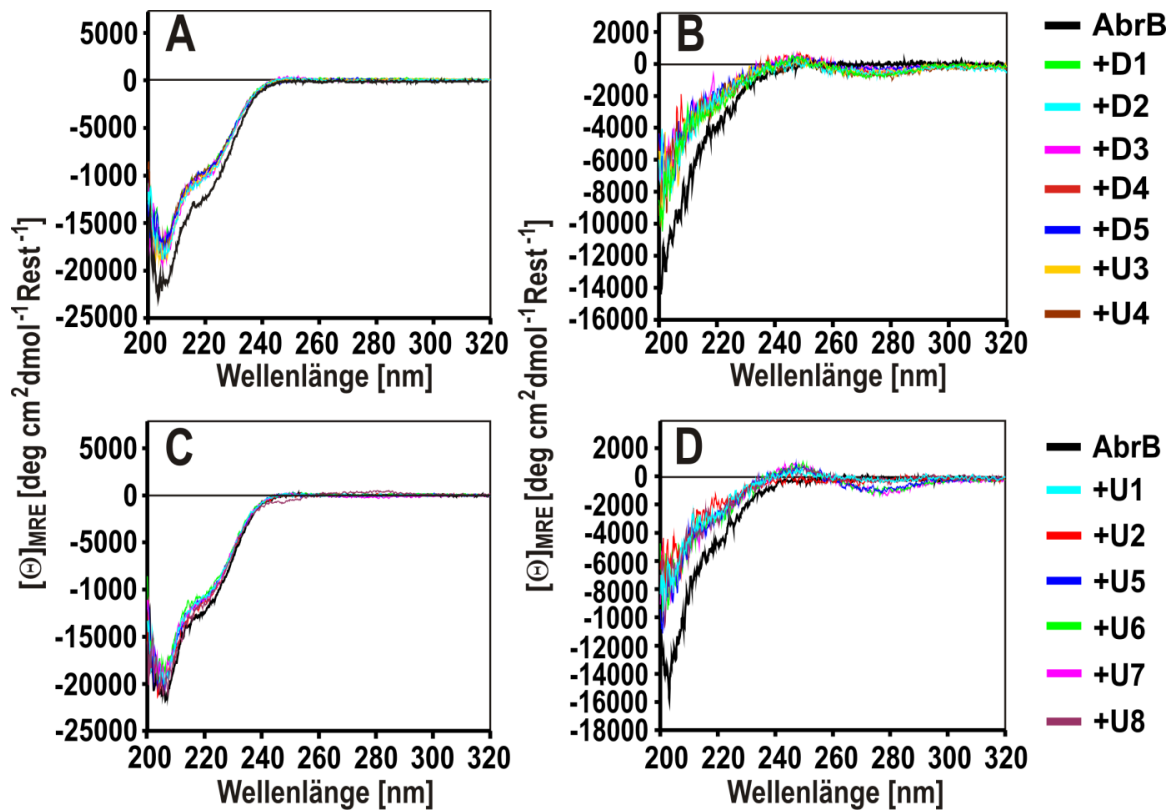


Abbildung 2.25: CD-Spektrumverlauf von einzelnen AbrB-Proteinen aus *B. subtilis* und im Komplex mit ds-DNA-Oligonukleotiden.

Das Spektrum vom freien *full-length* AbrB (A, C) bzw. AbrBN (B, D) und die Spektren von AbrB in Komplex mit DNA-Oligonukleotiden der Gruppe I (A, B) und der Gruppe II (C, D). Zehn Scanspektren wurden von jeder Probe (Puffer, DNA, Protein, Komplex) akkumuliert und gemittelt. Alle Scans liefen von 320 bis 200 nm. Für die Bindungsassays wurden 20 μM AbrB und 2,5 μM DNA (2 AbrB-Tetramere:1 DNA bzw. 4 AbrBN-Dimere:1 DNA) eingesetzt. Das Spektrum der entsprechenden DNA wurde von dem Komplex-Spektrum subtrahiert. Der Spektrumverlauf erfolgte in [mdeg] und wurde in mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta]_{\text{MRE}}$ mit der Einheit $[\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{Rest}^{-1}]$ umgerechnet.

Die CD-Spektroskopie eignet sich auch zur Analyse der DNA-Verformung, die durch Proteinbindungen verursacht werden. Gemessen werden dabei die Baseninteraktionen, die sehr empfindlich auf die Distanz und Orientierung der benachbarten Basen reagieren (Bobay *et al.* 2004). Die CD-Spektren der reinen ds-Oligonukleotide zeigten alle die für die B-Form der DNA typischen Verläufe, die ein Maximum bei ~ 275 nm und ein Minimum bei ~ 245 nm aufwiesen (Tunis-Schneider *et al.* 1970). Die leichten Verschiebungen der Maxima zu 275 nm variierten dabei je nach GC-Gehalt der jeweiligen ds-Oligonukleotide (Abbildung 2.26 B). Dieser Effekt wurde bereits in der Literatur beschrieben (Kypr *et al.* 2009). So wird das Maximum durch einen sehr hohen Anteil an AT-Gehalt nach rechts zu 285 nm verschoben, wie das Spektrum des U8-Oligonukleotides mit einem 82 %-igen AT-Anteil sichtbar machte. Ein hoher GC-Gehalt (~ 60 %), wie dies bei dem D5-Oligonukleotid

der Fall ist, hat eine Verschiebung des Maximums stärker nach links, in Richtung 270 nm zu Folge.

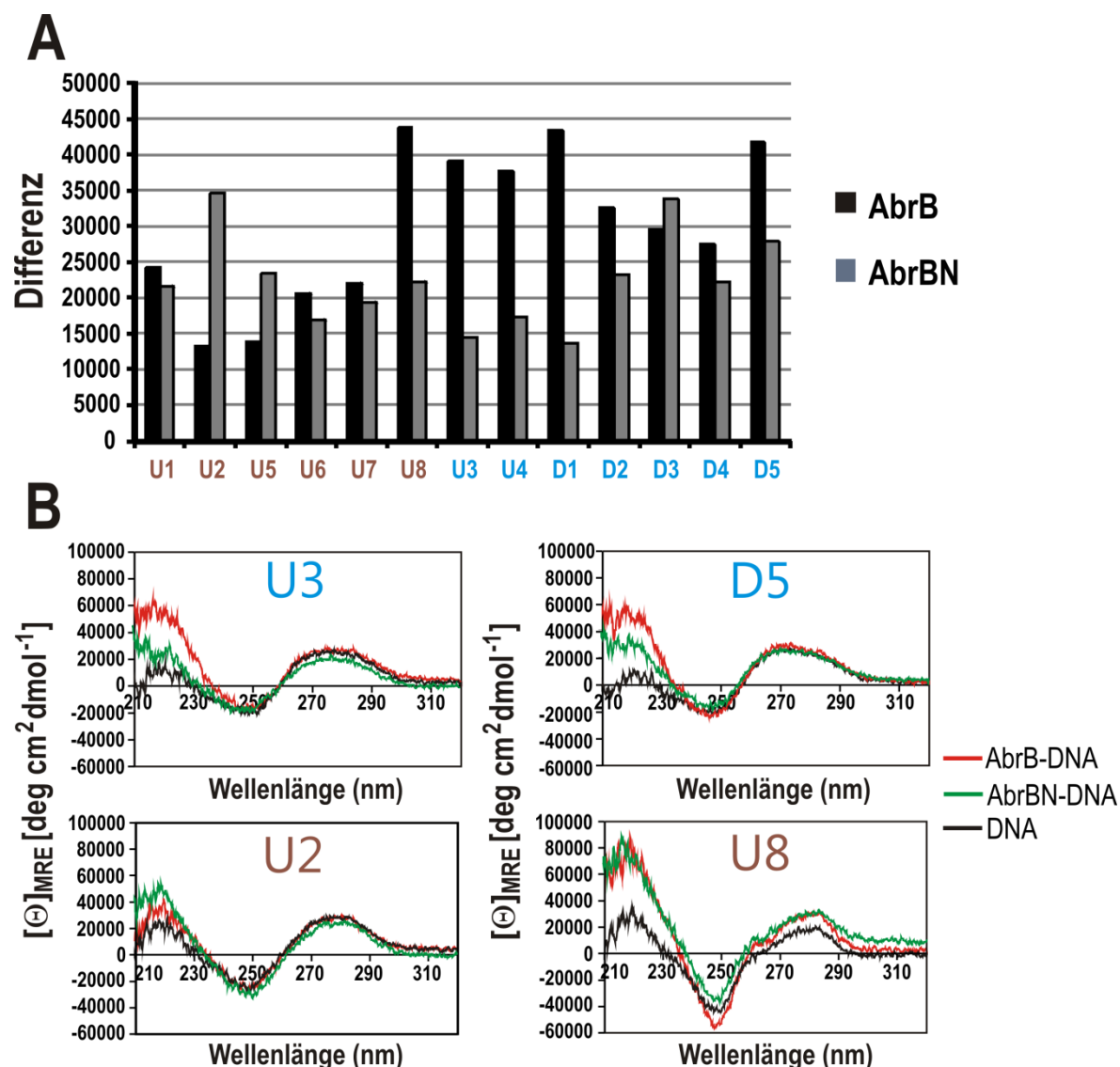


Abbildung 2.26: Auswertung der DNA-Strukturänderungen aus den CD-Daten.

(A) Das Balkendiagramm präsentiert die Intensitätsdifferenzen zwischen den freien Oligonukleotiden und den AbrB-DNA-Komplexen. Die Intensitäten θ_{MRE} wurden aus dem Maximum bei 219 nm abgeleitet. Die Eingliederung der ds-Oligonukleotiden in GI und GII erfolgte anhand der SPR-Messungen. (B) Vier Beispiele von CD-Spektren der DNA und den Protein-DNA-Komplexen (CD-Spektren von allen DNA-Oligonukleotiden im Anhang Abbildung 7.16). Die Protein-Spektren wurden dafür von den Spektren der DNA-Protein-Komplexen subtrahiert. Die resultierenden CD-Spektren wurden mit denen von freier DNA verglichen. Für die Bindungsassays wurden 20 μ M AbrB und 2,5 μ M DNA eingesetzt. Zehn Scanspektren wurden von jeder Probe (Puffer, DNA, Protein, Komplex) akkumuliert und gemittelt. Alle Scans liefen von 320 bis 200 nm. Der Spektrumverlauf erfolgte in [mdeg] und wurde in mittlere molare Elliptizität $[\theta]$ pro Basenpaarlänge mit der Einheit [deg cm² dmol⁻¹] umgerechnet.

Bobay und Mitarbeiter (2004) zeigten bereits, dass die CD-Spektren von *sinIR*, *spoOE* und BS18-Aptomer in Gegenwart von AbrB Veränderungen bei 280 nm und 215 nm aufwiesen. Im Komplex mit AbrB zeigten auch die Spektren aller ds-Oligonukleotide

deutliche Erhöhungen der molaren Elliptizität bei ~220 nm. Damit beeinflussten sowohl AbrB als auch AbrBN signifikant die DNA-Struktur (Abbildung 2.26 B). Bei einem Maximum um 275 nm wurden sehr unterschiedliche Effekte in Gegenwart von AbrB bzw. AbrBN beobachtet, die weder mit dem AT-Gehalt der Oligonukleotide, noch mit der Gruppierung der Oligonukleotide (GI bzw. GII nach den SPR-Daten) in Zusammenhang gebracht werden konnten.

Um die AbrB-verursachten Unterschiede in der DNA-Verformung zu verdeutlichen, wurden die Intensitätsdifferenzen zwischen den freien Oligonukleotiden und den AbrB-DNA-Komplexen bei 219 nm (Maximum) dargestellt (Abbildung 2.26 A). Dabei wurde erkennbar, dass die DNA-Oligonukleotide D1, D2, D5, U3 und U4 (GI) und U8 (GII) in Gegenwart von AbrB stärkere Strukturänderung im Vergleich zu den anderen ds-Oligonukleotiden aufwiesen. Wohingegen AbrBN bei fast allen ds-Oligonukleotiden ähnliche Strukturänderungen verursachte. Die Oligonukleotide U2, D3, D5 dagegen zeigten eine stärkere DNA-Verformung in Gegenwart von AbrBN.

Die CD-Spektren der Oligonukleotide haben die Eigenschaft der AbrB-Bindungsstellen, die bereits für *sinIR* und *spoOE* beschrieben wurde, bestätigt (Bobay *et al.* 2004): auf Grund ihrer hohen Flexibilität hat die DNA die Fähigkeit ihre Struktur bei der Bindung an AbrB zu verändern.

2.3.2 Sekundärstrukturen der AbrB- und AbbA-Proteine

Zum Ableiten der Sekundärstrukturen von AbrB und AbbA aus den CD-Daten wurde der *online*-Server DichroWeb verwendet (Whitmore *et al.* 2004). Der Server ermöglichte die Dekonvolution unter Nutzung der algorithmischen Programme SELCON3 (Sreerama *et al.* 1993, Sreerama *et al.* 1999, Sreerama *et al.* 2000b), CONTIN (Provencher *et al.* 1981, Van Stokkum *et al.* 1990) und CDSSTR (Compton *et al.* 1986, Sreerama *et al.* 2000b). Innerhalb jedes Algorithmus waren acht Datensätze mit unterschiedlichen Referenzproteinen vorhanden (Sreerama *et al.* 2000b, Whitmore *et al.* 2004, Whitmore *et al.* 2008), deren Kristallstrukturen zu CD-Spektren korreliert wurden. Hier wurden nur die Datensätze 3, 4, 6, 7 und SP175 zur Sekundärstrukturanalyse verwendet, da diese die Auswertung der CD-Spektren im Wellenbereich zwischen 185 und 240 nm ermöglichten. Der NRMSD-Wert (*normalized root mean square deviation*; normierte Standardabweichung), der aus jedem Datensatz abgeleitet wurde, diente als Qualitätsmerkmal der errechneten Parameter. Die berechnete Sekundärstruktur für ein Protein wurde nur dann akzeptiert, wenn I) NRMSD<0,1 bei CDSSTR bzw CONTIN und NRMSD<0,258 bei SELCON3 ermittelt wurde und II) die graphische Anpassung (*fit*) des errechneten Spektrums (*output*) mit dem experimentell ermittelten Spektrum (*input*) die

kleinstmögliche Differenz aufwies (Whitmore *et al.* 2004). Der tabellarische Datenausgang (*output*) lieferte die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturen: α -Helices (*helix 1* und *helix 2*), β -Faltblattstrukturen (*strand 1* und *strand 2*), β -Schleife (*turns*) und ungeordnete Strukturelemente (*natively disordered*) (Tabelle 7.5). *Helix 1* stellt hierbei eine reguläre Helix α_R aus mindestens 4 AS-Resten dar und umfasst den zentralen Teil der α -Helix und 3_{10} -Helix (Sreerama *et al.* 1999). *Helix 2* entspricht einer deformierten Helix α_D , welche an jedem Ende einer regulären Helix vorkommt und durchschnittlich vier AS-Reste pro α_R umfasst. Die terminalen Enden der α -Helix (α_D) weisen im Vergleich zum inneren Teil der α -Helix (α_R) ein anderes H-Brückenbindungsmuster auf. Die deformierte Faltblattstruktur β_D (*strand 2*) umfasst durchschnittlich zwei AS-Reste pro β_R -Strang. Es ist wichtig zu beachten, dass die Sekundärstrukturen in nativen Proteinen keiner einheitlichen Geometrie folgen und abweichende Merkmale, wie gebogene α -Helices, 3_{10} -Helix (β -Schleife des Subtyps III) und verdrehte β -Schleifen so wie rechts- oder linksgängig gewundene, parallel verlaufende β -Faltblätter mit planaren oder nicht-planaren Peptidbindungsebenen aufweisen können (Weatherford *et al.* 1979, Perczel *et al.* 1992, Sreerama *et al.* 1999, Ballesteros *et al.* 2000), die sich in abweichenden Torsionswinkeln (ϕ ; φ) widerspiegeln. Die breite Datenbank der Referenzproteine des DichroWeb-Servers ermöglicht, diese geometrische Variabilität der Sekundärstrukturen gut zu erfassen (Sreerama *et al.* 1999). Die Proteine mit ungewöhnlichen supersekundären Strukturen, wie Polyprolin II Helices und Coiled-Coils und Proteine mit hohem Anteil an ungeordneten Strukturen, sind in der Referenzdatenbank nicht ausreichend vertreten. Strukturelemente, die in vielen Fällen gut definiert sind, die jedoch eine starke Abweichung von fest definierten Torsionswinkeln der α -Helices, β -Faltblattstrukturen und β -Turns aufweisen, und eher mangelhaft aus der Referenzdatenbank erfasst werden, werden als *natively disordered* eingestuft (Whitmore *et al.* 2008).

2.3.2.1 Sekundärstruktur von AbrB und der C-terminalen Domäne

Die CD-Spektren von AbrB aus *B. subtilis* (BS) und *B. amyloliquefaciens* FZB45 (BA) zeigten einen identischen Verlauf von gleicher Intensität mit zwei unsymmetrischen, negativen Peaks bei ungefähr 206 nm und 219 nm (Abbildung 2.27 A), die vorher in der Literatur zu AbrB und AbrBN beschrieben wurden (Bobay *et al.* 2004). Allerdings zeigte AbrBN, im Gegensatz zu *full-length* AbrB, nur ein zum fernen UV-Bereich verschobenes Minimum (~ 203 nm) und einen schulterähnlichen Spektrumverlauf bei ~ 214 nm. Die CD-Spektren der beiden *full-length* AbrB-Proteine zeigten eine Kombination aus β -Faltblatt Elementen mit einem Minimum bei 219 nm und α -Helix-Elementen mit einem deutlichen Maximum bei 190 nm sowie einem negativen Peak um 209 nm (Whitmore *et al.* 2008).

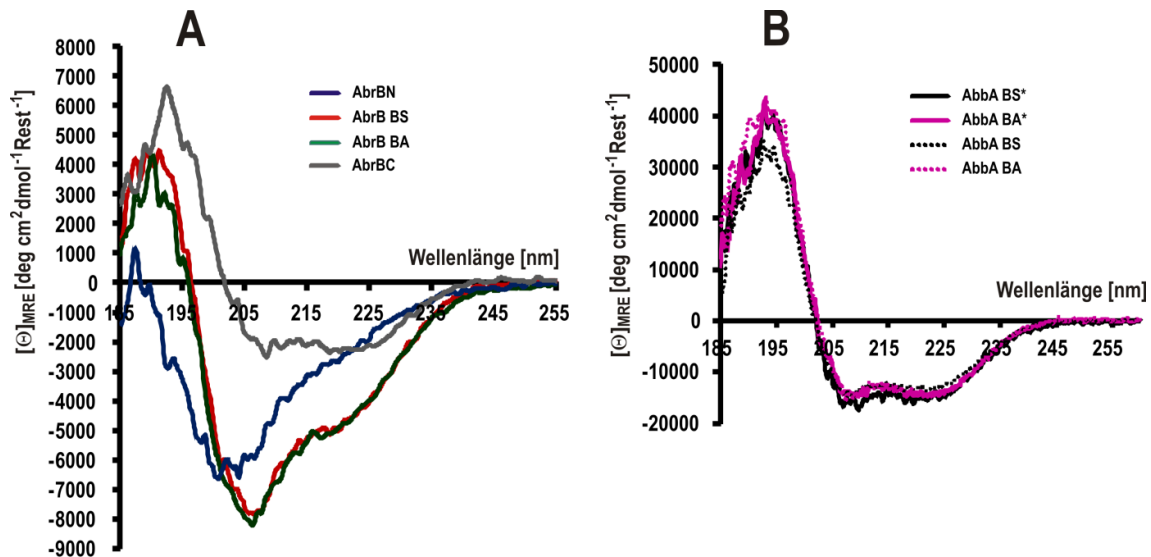


Abbildung 2.27: CD-Spektren von (A) AbbA- und (B) AbrB-Proteinen im fernen und nahen UV-Bereich.

Die Messung von jedem Protein wurde dreimal wiederholt und jedes einzelne CD-Spektrum mit DichroWeb separat ausgewertet. Zwanzig Scanspektren jeder Proteinprobe wurden akkumuliert und gemittelt. Der graphische Datenausgang (*output*) erfolgte in mittlerer molarer Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta]_{\text{MRE}}$ mit der Einheit $[\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{Rest}^{-1}]$. AbbA-Proteine wurden mit und ohne His-Tag* untersucht. CD-Spektrum der C-terminalen Domäne stellt das Differenzspektrum aus dem *full-length* AbrB und AbrBN dar. Das Messprinzip zur Zirkulardichroismus-Spektroskopie wird in der Abbildung 5.6 und Abbildung 5.7 dargestellt.

Der für eine α -helikale Faltung untypische Spektrumverlauf mit geringer Signalintensität im Bereich von 209 nm bei AbrB bzw. 203 nm bei AbrBN, deutete eher auf einen geringen Anteil an α -Helices (Ezomo *et al.* 2010), dafür einen hohen Anteil an β -Turns und ungeordneten Strukturen hin (Sreerama *et al.* 2000a, Lees *et al.* 2006, Whitmore *et al.* 2008). Die Ergebnisse der Sekundärstrukturauswertung sind für die verschiedenen AbrB- und AbbA-Varianten in Tabelle 2.5 zusammengefasst. Alle drei AbrB-Proteine zeigten einen hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen ($\sim 29\%$ bis $33,5\%$). Wie der Tabelle 2.5 zu entnehmen ist, wurde der helikale Anteil bei *full-length* AbrB deutlich höher erfasst. Um die Unterschiede zwischen AbrB und AbrBN besser zu verdeutlichen, wurde die ermittelte Prozentigkeit der Sekundärstrukturelemente auf die Aminosäureanzahl, unter Berücksichtigung der Proteingesamtlänge, umgerechnet. Es ist hier zu erwähnen, dass die für die CD-Messungen verwendeten AbrB-Proteine alle einen N-terminalen His-Tag aus 20 Aminosäuren besaßen. Aus NMR-Strukturen von unterschiedlichen rekombinanten Proteinen weiß man, dass der His-Tag eine unstrukturierte, verlängerte Form annimmt (Fletcher *et al.* 1999). Nach der Korrektur der Werte, um den auf den His-Tag zurückzuführenden Anteil an ungeordneten Strukturen (AbrBN $26,5\%$ und bei AbrB $17,5\%$), zeigte das verkürzte AbrBN im Vergleich zum AbrBN₅₃, dessen NMR-Struktur von Sullivan und Mitarbeitern (2008) verfeinert wurde, einen relativ geringen Unterschied in

der Verteilung der ungeordneten Strukturen (9-11 AS). Beide AbrBN Proteine (AbrBN und AbrBN₅₃) zeigten auch vergleichbare Aminosäurenanteile an β -Faltblatt (25 AS), an β -Turn (12-14 AS) und α -Helices (\sim 4-7 AS). Beide *full-length* AbrB-Proteine, die sich nur an einer AS-Position Q81K im C-Terminus unterscheiden, lieferten beinahe gleiche AS-Anteile bei β -Turn und den ungeordneten Strukturen, sowie ähnliche Anteile bei fest definierten Strukturen (Unterschied um ungefähr vier AS).

Tabelle 2.5: Sekundärstrukturelemente der AbrB-Proteine.

Die Auswertung erfolgte mit den algorithmischen Programmen CDSSTR, CONTIN und SELCON3 des *online* DichroWeb-Servers. Die Werte der Referenzdatenbank mit niedrigem NRMSD<0,1 bzw. NRMSD<0,258 bei SELCON3 wurden akzeptiert und gemittelt. Bei AbrBN wurden die Ergebnisse nur der CDSSTR-Berechnung akzeptiert. Prozentuale Angaben zu α -Helix und β -Faltblatt umfassen die regulären (α_R ; β_R) und die deformierten (α_D ; β_D) Strukturen. AbrB BS bzw. BA besteht aus 114 AS, AbrBN aus 75 AS und AbrBC aus 39 AS. Die Aminosäureanzahl der Sekundärstruktur wurde aus der Prozentigkeit, bezogen auf die Gesamtproteinelänge, ermittelt. Die Angaben in Klammern bei *natively disordered* Struktur beziehen sich auf das Protein ohne den 20 AS-langen His-Tag. Die prozentualen Angaben zu AbrBN₅₃ wurden aus den Sekundärstrukturelementen der NMR-Struktur (Sullivan *et al.* 2008) berechnet. BS = *Bacillus subtilis* 168, BA = *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45. #AbrBN₅₃ von Sullivan *et al.* (2008).

	α -Helix		β -Faltblatt		β -Turn		<i>natively disordered</i>	
	AS	%	AS	%	AS	%	AS	%
#AbrBN ₅₃	7	13,2	25	47,2	12	26,6	9	17
AbrBN	4,4	5,8	25	33,5	14	18,3	31,1 (11)	41,5 (14,8)
AbrB BS	16,2	14,2	33,3	29,2	21,1	18,5	41,7 (21,7)	36,6 (19)
AbrB BA	12	10,5	37,5	32,9	22,2	19,5	41,9 (21,9)	36,8 (19,2)
AbrBC	12	31	8	21	7,5	18	11	28

Vom besonderen Interesse war es bei der Dekonvolution der Sekundärstrukturen des *full-length* AbrB und des verkürzten AbrB, die bis lang unklare Sekundärstruktur der C-terminalen Domäne zu ermitteln. Aus der Aminosäuredifferenz zwischen dem AbrB BS und dem AbrBN war es möglich, die Aminosäurenanteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente der C-terminalen Domäne abzuleiten und die dazu gehörigen Prozentigkeiten unter der Berücksichtigung der Gesamtlänge (39 AS) des C-Terminus zu berechnen. Der C-terminalen Domäne konnte ein Anteil an α -Helices mit 12 AS (31 %), an β -Faltblattstrukturen mit \sim 8 AS (21 %), an β -Turns mit 7,5 AS (18 %) und an ungeordneten Strukturen mit 11 AS (28 %) zugeordnet werden (Tabelle 2.5). Zusätzlich wurde ein CD-Spektrum für die C-terminale Domäne aus der Differenz der beiden CD-Spektren des *full-length* AbrB und des AbrBN abgeleitet (Abbildung 2.27 A). Das Differenzspektrum wies deutlich einen für die helikalen Strukturen definierten

Spektrumverlauf auf. Jedoch die geringe Elliptizitäten der Minima (~ 222 nm und ~ 208 nm) und des Maximums (192 nm) deuteten darauf hin, dass neben den α -Helices auch andere Sekundärstrukturen stark dominierten.

Anhand der CD-Analyse konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne, zusätzlich zu ungeordneten Strukturen, auch fest definierte Sekundärstrukturelemente, wie α -Helices, β -Faltblätter und β -Turns, aufweist.

2.3.2.2 Sekundärstruktur von AbbA

Die CD-Methode lieferte den ersten Einblick in die Sekundärstruktur des AbrB-Antirepressors AbbA. Die AbbA-Proteine zeigten einen für α -Helices charakteristischen Spektrumverlauf mit zwei negativen Peaks bei ungefähr 222 nm und 208 nm und einen positiven Peak mit hoher Signalintensität bei 192 nm. Solche starke CD-Signale wurden für α -Helix-reiche Proteine bereits gut beschrieben (Whitmore *et al.* 2008). Die AbbA-Spektren zeigten im Gegensatz zu den AbrB-Spektren eine ungefähr zehnfach höhere Elliptizität im Bereich um 192 nm.

Tabelle 2.6: Sekundärstrukturelemente der AbbA-Proteine.

Die Auswertung erfolgte mit den algorithmischen Programmen CDSSTR, CONTIN und SELCON3 des *online* DichroWeb-Servers. Prozentuale Angaben zu α -Helix und β -Faltblatt umfassen die regulären (α_R ; β_R) und die deformierten (α_D ; β_D) Strukturen. *AbbA BS bzw. BA ohne His-Tag besteht aus 68 AS. Die Aminosäureanzahl der Sekundärstruktur wurde aus der Prozentigkeit, bezogen auf die Gesamtproteinlänge, ermittelt.

	α -Helix		β -Faltblatt		β -Turn		<i>natively disordered</i>	
	AS	%	AS	%	AS	%	AS	%
*AbbA BS	40,3	59,3	6,5	9,6	8,1	11,9	13,1	19,3
*AbbA BA	38,5	56,6	7,5	11	8,8	12,9	13,5	19,8

Da keine Vergleichsdaten zu den AbbA-Proteinen vorlagen, wurden die AbbA-Proteine für die Sekundärstrukturbestimmung mit und ohne His-Tag untersucht. Für die AbbA-Proteine aus *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* wurde eine hohe Aminosäuresequenzidentität von 89,3 % (Abbildung 7.2) ermittelt. So war es nicht überraschend, dass für die AbbA-Proteine sehr ähnliche Spektrumverläufe gemessen wurden (Abbildung 2.27 B). Für die His-Tag-freien AbbA-Proteine wurden beinahe gleiche AS-Anteile an den verschiedenen Strukturen errechnet. Die AbbA-Proteine wiesen somit einen hohen helikalen Anteil von 60 % auf, der ca. 38 bis 40 Aminosäuren der Gesamtproteinlänge ausmachte (Tabelle 2.6). Der His-Tag von AbbA verursachte eine

Diskrepanz bei der Dekonvolution der Sekundärstrukturen (Tabelle 7.6) und wurde hier aus diesem Grund nicht präsentiert. Jedoch konnten *in vitro* Bindungsassays (Dolgova 2011) zeigen, dass der His-Tag keine Auswirkung auf die AbbA-Funktionalität hatte.

2.3.3 Auswirkung von AbbA auf die AbrB-DNA-Interaktion

Die Bindungsstudien mit DNA und AbbA bestätigten, dass AbbA konzentrationsabhängig den Transkriptionsrepressor AbrB von der DNA verdrängt (Abbildung 2.24). Damit stellte sich die Frage, ob AbbA mit AbrB allosterisch oder als Kompetitor der DNA interagiert? Für diese Fragestellung wurde ebenfalls eine sensitive CD-Methode angewandt. Dabei ließen sich die CD-Spektren von den einzelnen Bindungspartnern und den Komplexen subtraktiv auswerten, so dass man die Spektren der beteiligten Bindungspartner im Komplex einzeln betrachten und im Vergleich zu ungebundenen Analyten die Veränderungen in der Sekundärstruktur determinieren konnte.

Die Spektralwerte im fernen UV-Bereich ab 205 nm wurden nicht berücksichtigt, da hier ein starkes Signalrauschen die Spektren verzerrte. Das starke Rauschen in diesem Bereich trat I) aufgrund der verwendeten 1 mm-Quarzglasküvette, die für ein großes Probenvolumen am besten geeignet war, und II) wegen der hohen Proteinkonzentrationen, die für die Untersuchung der Bindungsinteraktionen notwendig waren, auf. Aus diesem Grund war es nicht möglich, die veränderten Sekundärstrukturen mit den algorithmischen Dichroweb-Programmen quantitativ auszuwerten. So wurden die Konformationsänderungen im AbrB und AbbA nur qualitativ untersucht.

Die Bindungsassays erfolgten mit AbrB BS (20 μ M) im Komplex entweder mit dem D4-Oligonukleotid (5 μ M) der Gruppe I oder mit seinem Antirepressor AbbA BS (40 μ M) bei einer konstanten Konzentration. Da das AbrB-Protein als ein Homotetramer (AbrB_4) und das AbbA als ein Dimer (AbbA_2) vorlagen (Abbildung 7.9), entsprachen die verwendeten Konzentrationen 5 μ M AbrB_4 und 20 μ M AbbA_2 einem Verhältnis von 1:4, wodurch der Antirepressor im Überschuss vorlag (1 AbrB_4 :4 AbbA_2). Dieses Verhältnis wurde anhand der Gelretardationsassays (Abbildung 2.24) ermittelt, bei denen mindestens die vierfache Menge an AbbA-Dimeren notwendig war, um den AbrB_4 -DNA-Komplex aufzulösen.

Es konnte gezeigt werden, dass AbbA bei der Interaktion mit AbrB die gleiche Veränderung in der AbrB-Konformation verursachte, wie das DNA-Oligonukleotid. Es wurden vergleichbare Intensitätsabweichungen im CD-Spektrum von AbrB im Wellenbereich zwischen 205 nm und 230 nm durch beide, sowohl AbbA als auch DNA, induziert (Abbildung 2.28 A). Diese Tatsache erlaubte zu postulieren, dass hier ein kompetitiver Mechanismus vorlag und sowohl die DNA als auch das AbbA um eine und

dieselbe Bindungsstelle im AbrB-Tetramer konkurrierten. Das AbrB verursachte in dem für die α -Helices charakteristischen AbbA-Spektrumverlauf eine Erhöhung der negativen Elliptizität bei ungefähr 222 nm und 208 nm (Abbildung 2.28 B). Somit erfolgte eine Induktion der Konformationsänderung im AbbA-Protein durch AbrB.

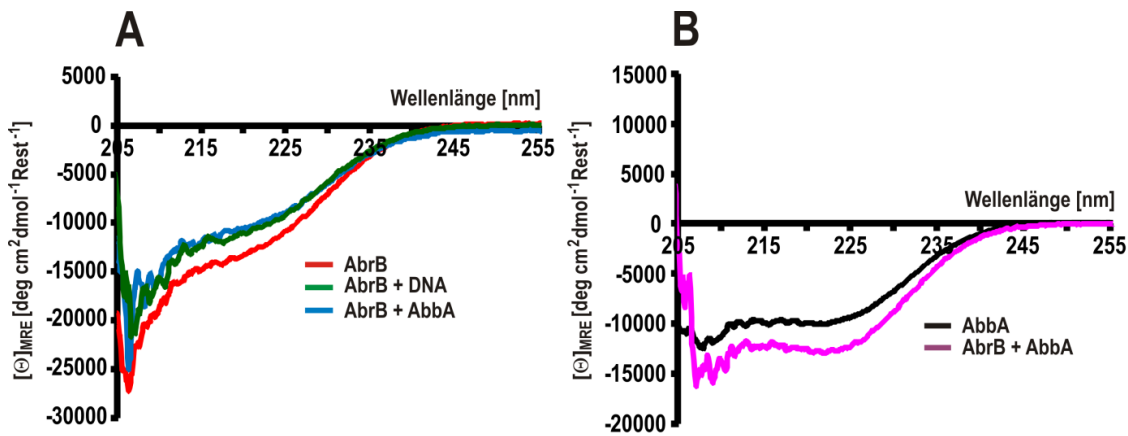


Abbildung 2.28: CD-Spektrumverlauf von AbrB-DNA- bzw. AbrB-AbbA-Komplexen.

(A) Das Spektrum von reinem AbrB aus *B. subtilis* (BS) (rot) und die Spektren von AbrB in Komplex mit dem D4-Oligonukleotid (grün) bzw. AbbA BS (blau). (B) Das Spektrum von reinem AbbA-Protein (schwarz) und das von AbbA BS in Komplex mit AbrB BS (magenta). Der Spektrumverlauf erfolgte in [mdeg] und wurde in mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta]_{MRE}$ mit der Einheit $[\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{Rest}^{-1}]$ umgerechnet. Die Bindungsassays erfolgten bei einer konstanten Konzentration von AbrB BS (20 μM) im Komplex: entweder mit dem D4-Oligonukleotid (5 μM) von ABS2 oder mit seinem Antirepressor AbbA BS (40 μM) in einem 150 μl Probevolumen in einer 1 mm-Quarzglasküvette (Hellma).

2.4 SAXS-Strukturen

2.4.1 Auswertung der SAXS-Messdaten

Die Kleinwinkelstreuung der Röntgenstrahlung (*Small-angle X-ray scattering* - SAXS) ist eine geeignete Methode, um die ungeordneten Probensysteme, wie z.B. die von gelösten Proteinen, analysieren zu können. Die SAXS-Methode wird angewendet, wenn die Voraussetzungen für die Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie nicht gegeben sind und kann sowohl eine Auflösung der kleinen Proteinen (1 bis 10 kDa), als auch die von den großen Proteinkomplexen (bis mehrere hundert MDa) (Svergun *et al.* 2001, Mertens *et al.* 2010) ermöglichen. Dabei wird aber nur die Information über die Größe und die Form des Proteins oder der Komplexe gewonnen. Es ist zu betonen, dass die Kleinwinkelstreuung eine Methode mit geringer Auflösung ist, so dass keine Aussagen über die innere Struktur des untersuchten Proteins getroffen werden können.

Die SAXS-Messungen der AbrB- und AbbA-Proteine erfolgten an der X33-BioSAXS-Strahllinie (*beamline*) (Roessle *et al.* 2007), welche die von dem DORISIII-Ringbeschleuniger (Kapitel 5.3.8.1) erzeugte Röntgenstrahlung nutzte. Bei den SAXS-Messungen an der X33-Strahllinie wurden elastische Streuungen von den Röntgenstrahlen

unter sehr kleinen Streuwinkeln ($2\theta = 0,1$ bis 10°) aufgezeichnet und zu einem Wellenvektorübertrag s [nm^{-1}] umgerechnet ($s = 4\pi \sin \theta / \lambda$, wobei $\lambda = 1,5 \text{ \AA} = 0,15 \text{ nm}$ ist; Methoden: Kapitel 5.3.8.2 und 5.3.8.5, Abbildung 5.9). In einem Probe-Detektor-Abstand von 2,7 m nahm der Detektor (MAR345) die Streuungsintensitäten I über den breiten Bereich des Wellenvektorübertrags von $s = 0,08 \text{ nm}^{-1}$ bis $\sim 5 \text{ nm}^{-1}$ auf. Jede SAXS-Messung dauerte 2 min bei 8° C und verlangte das Probenvolumen von $60 \mu\text{l}$. Es wurden Proteinproben mit den unterschiedlichen Konzentrationen (jeweils $2,5 \text{ mg/ml}$ und 5 mg/ml) vermessen. Der zu jedem Protein entsprechende Dialysepuffer wurde unter den entsprechenden Bedingungen als Referenz vermessen.

Die Analyse und die Auswertung der SAXS-Daten erfolgten mittels der Software ATSAS (Konarev *et al.* 2003, Konarev *et al.* 2006) unter Verwendung der Programme PRIMUS, GNOM, GASBOR, DAMAVER. Mit Hilfe von PRIMUS (Konarev *et al.* 2003) wurden die Streukurven (der Logarithmus der Streuungsintensität I als eine Funktion des Wellenvektorübertrags s [nm^{-1}]) der Puffer und die der Proteinproben von unterschiedlichen Konzentrationen (2 mg/ml und 5 mg/ml) dargestellt. Die Streukurven der Puffer wurden von den jeweiligen Streukurven der Proteinproben innerhalb der s -Bereiche (Wellenvektorübertrag) von $0,14 \text{ nm}^{-1}$ bis $2,59 \text{ nm}^{-1}$ für AbrB, $0,29 \text{ nm}^{-1}$ bis $4,48 \text{ nm}^{-1}$ für AbrBN und $0,21 \text{ nm}^{-1}$ bis $3,42 \text{ nm}^{-1}$ für AbbA subtrahiert (*subtraction*). Die Differenzkurven der unterschiedlichen Proteinkonzentrationen wiesen die unterschiedliche Datenqualität der Messbereiche auf und wurden deshalb entsprechend zusammengesetzt (*merging*), indem die niedrigen Werte des s -Bereichs der Proben mit einer niedrigen Proteinkonzentration und die hohen Werte des s -Bereichs der Proben mit einer hohen Proteinkonzentration verwendet wurden. Die resultierende Streukurven (Abbildung 2.29) wurden dann angepasst (*fitting*) und anschließend ein Guinier-Plot (Auftragung $\ln I(s)$ gegen s^2) abgeleitet, der den Gyrationradius (Streumassenradius) R_g , lieferte (Tabelle 2.7). Dabei ist R_g ein Maß für die räumliche Ausdehnung der für die Streuung verantwortlichen Partikel (Guinier *et al.* 1955). Die Gültigkeit der Guinier-Annäherung konnte sowohl für die sphärischen, als auch für die homogenen Teilchen bis zu einem Wert von $s_{\text{max}} < 1,3/R_g$ angenommen werden, wobei s_{max} die obere Intervallgrenze, des für die Anpassung verwendeten s -Bereiches, angab (Svergun *et al.* 2003, Mertens *et al.* 2010).

Das GNOM-Programm ist eine indirekte mathematische Transformation (Svergun 1992), die eine eindimensionale Streukurve auswertet und den maximalen Proteinpaketel-Durchmesser D_{max} ableitet. Die beiden Werte, R_g und D_{max} (Tabelle 2.7), wurden für die Auswertung mit dem GASBOR-Programm benötigt (Svergun *et al.* 2001, Mosbaek *et al.* 2010). Zur Bestimmung der Proteingestalt mit dem GASBOR wurden die Werte der

merged-fitted Streukurve bis s_{\max} verwendet, da diese die Gestalt des Proteins am genauesten wiedergaben.

Tabelle 2.7: Die für die Auswertung mit GASBOR benötigten Parameter.

Der s -Bereich [nm^{-1}] der resultierenden Streukurve nach der Subtraktion des Puffers. **Zur Bestimmung der Proteinform mit dem GASBOR wurden die Daten bis s_{\max} verwendet. R_g steht für den Gyrationradius und D_{\max} ist der maximale Teilchendurchmesser (maximale Größe des Proteins). Eine gute Qualität der Proteinprobe liegt vor, wenn $s_{\max} < 1,3/R_g$ gilt. #Die Punktsymmetrie ist ein Sonderfall der Drehsymmetrie. ##Die Anzahl der berechneten *dummy*-Reste sollte der AS-Anzahl des Proteins gleich sein, die sich auf AbrB-Tetramer, AbrBN-Dimer und AbbA-Dimer bezieht.

Parameter	AbrB	AbrBN	AbbA
s -Bereich [nm^{-1}]*	0,14 bis 2,59	0,29 bis 4,48	0,21 bis 3,42
D_{\max} [nm]	13,5	7,8	13,5
R_g [nm]	3,86	2,23	2,83
s_{\max} [$1/\text{\AA}$]**	0,259	0,448	0,342
Punktsymmetrie#	P22	P2	P2
<i>dummy</i> -H ₂ Os	378	145	90
<i>dummy</i> -Reste##	460	150	130

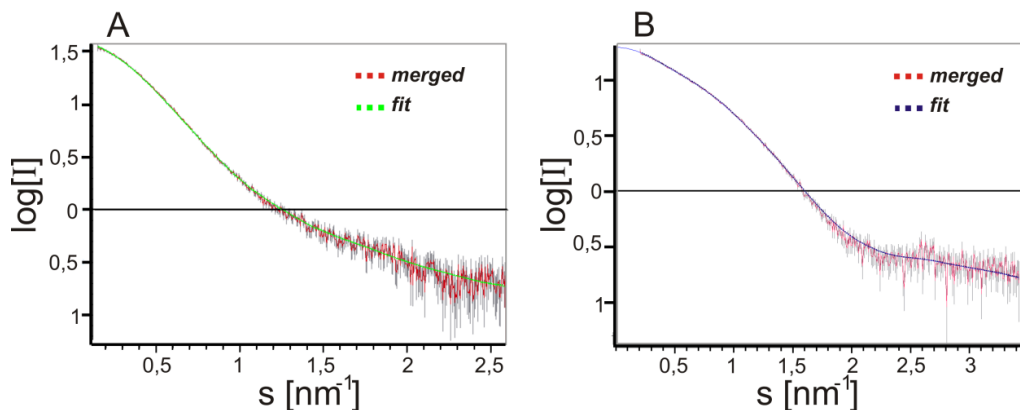


Abbildung 2.29: SAS-Plot: Logarithmus der Streuungsintensität I als eine Funktion des Wellenvektorübertrags s [nm^{-1}].

Die Differenz-Kurven (d.h. der Puffer wurde von der Proteinprobe subtrahiert) von AbrB (A) und AbbA (B) unterschiedlicher Proteinkonzentrationen wurden entsprechend zusammengesetzt (*merging*) und angepasst (*fit*). Die resultierende Kurve wurde für die Auswertung mit GNOM und anschließend mit GASBOR verwendet.

Um aus den Streukurven dreidimensionale Modelle der Proteingestalt zu ermitteln (*ab initio*), wurde das Programm GASBOR22 angewendet (Svergun *et al.* 2001). Das GASBOR nutzte *ab initio*-Methode (Svergun *et al.* 2001, Svergun 2010), bei der das Protein als ein Gefüge aus *dummy*-Resten angenommen wurde. Die Symmetrien (Tabelle 2.7), die in die Berechnung mittels GASBOR einbezogen wurden (P22 für AbrB, P2 für AbrBN, P2 für AbbA), wurden aus den bekannten Veröffentlichungen und einigen Vorexperimenten abgeleitet. Der Abstand zwischen den benachbarten C α -Atomen der AS-Kette eines Proteins betrug $\sim 0,38$ nm. Bei einer Auflösung von 0,5 nm, die das GASBOR-Programm bei der Anpassung der Daten ermöglichte, wurden die *dummy*-Reste an C α -Atomen angenähert. Zusätzlich wurden die *dummy*-Wasseratome als eine Hydrathülle außerhalb des Proteins angebracht (Svergun *et al.* 2001). Für die Datenanalyse bedeutete die vorhandene Hydrathülle, dass das Protein größer erscheint. Das GASBOR startet mit einer Generierung eines Kugelvolumens mit einem festgesetzten D_{max}-Wert (Tabelle 2.7). Innerhalb dieser Kugel waren die *dummy*-Reste wahllos verteilt. Die *dummy*-Reste wurden so lange entfernt bzw. umverteilt bis der Formfaktor (Theorie, Kapitel 5.3.8.3) der berechneten Proteinstruktur, der mittels GNOM berechnet wurde, mit der Streukurve übereinstimmte (Kapitel 5.3.8.5, Abbildung 5.10). Hier war die berechnete Anzahl an *dummy*-Resten mit der Anzahl der AS-Reste der polymeren Proteine identisch: dem AbrB-Tetramer, AbrBN-Dimer und AbbA-Dimer (Tabelle 2.7). Es wurden für jedes Strukturmodell fünfzehn bis zwanzig individuelle Berechnungen mittels GASBOR durchgeführt. Das DAMAVER-Programm diente dazu, die erzeugten Strukturmodelle zusammenzulegen und diese untereinander zu vergleichen. Anschließend wurden diejenigen Proteinstrukturen mit den kleinstmöglichen NSD (*normalized spatial discrepancy*) gemittelt.

2.4.2 SAXS-Struktur von AbrB und AbrBN

Die Strukturaufklärung des gesamten AbrB-Proteins war bislang nicht erfolgreich. Auf Grund der Größe konnten lediglich NMR- (*Nuclear Magnetic Resonance*)-Daten der N-terminalen Domäne AbrBN (Coles *et al.* 2005, Sullivan *et al.* 2008) gelöst werden. Die im Rahmen dieser Arbeit unternommenen Versuche (in Kooperation mit dem MDC, Berlin), eine Kristallstruktur sowohl des gesamten AbrB-Proteins als auch in Anwesenheit von zwei stark bindenden ds-Oligonukleotiden (GI) zu erhalten, scheiterten ebenfalls auf Grund fehlender Kristallbildung. Die C-terminale Domäne scheint zu stark beweglich zu sein, um stabile Kristalle des gesamten Proteins zu erzeugen. Deshalb wurde in einer Kooperation mit dem EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*, Hamburg) mittels Kleinwinkelstreuung (SAXS) das Protein in löslicher Form untersucht. Damit gelang es zum ersten Mal eine globale Struktur des gesamten AbrB-Tetramers aufzulösen.

In Vorexperimenten wurden Strukturmodelle von AbrB mittels *ab initio*-Methode ohne weiteren Symmetrieangaben berechnet. Dabei konnte eine doppelte Symmetrie ermittelt werden, die gut mit den hypothetischen Literaturangaben übereinstimmte (Cavanagh *et al.* 2002, Sullivan *et al.* 2008). Um die *ab initio*-Analyse der AbrB-Struktur zu optimieren (Mertens *et al.* 2010), wurde die P22-Symmetrie in die Berechnung mittels GASBOR einbezogen. Die SAXS-Messung von AbrBN diente dazu, die N-terminalen Domänen innerhalb des *full-length* AbrB einzuordnen.

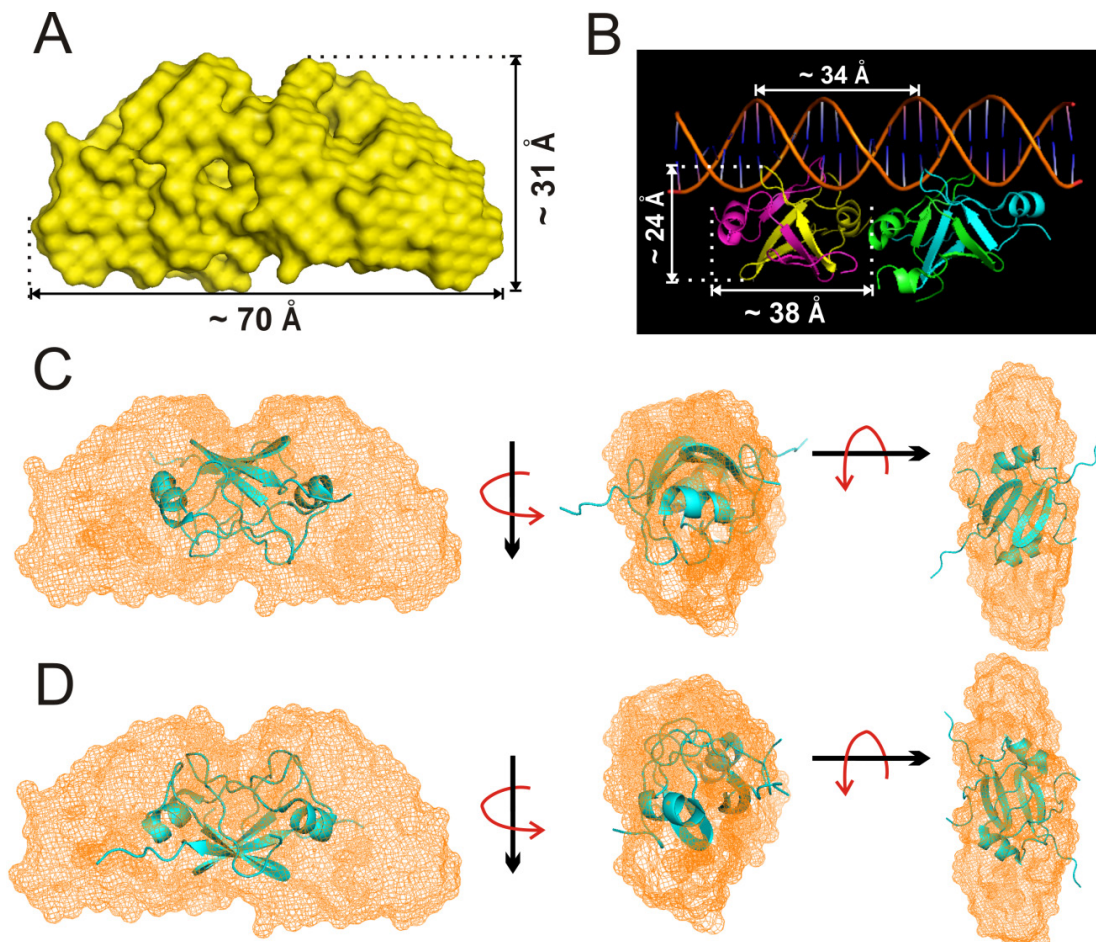


Abbildung 2.30: Strukturen des AbrBN-Dimers.

(A) Die SAXS-Struktur des AbrBN-Dimers (insgesamt 150 AS-Reste) wurde mittels GASBOR (Svergun *et al.* 2001) ermittelt. Über die *dummy*-Reste (als Kügelchen dargestellt) wurde eine Umhüllung (*surface*) gelegt. (B) Das Bindungsmodell zeigt die Modellierung beider AbrBN-Dimere an eine 25 bp lange DNA-Doppelhelix (*abrB8*). Ein AbrBN-Dimer besteht hier aus 110 AS (Sullivan *et al.* 2008). Der Abstand zwischen Met1-AS (1. Monomer) und Gln55-AS (2. Monomer) beträgt ~ 38 Å. (C) - (D) Die Superposition des AbrBN-Dimers (NMR-Struktur von Sullivan *et al.* (2008)) mit der SAXS-Struktur: die DNA-bindende Oberfläche zeigt entweder nach unten (C) oder nach oben (D). Die AbrBN-Struktur wurde um jeweils 90° gedreht. Die 3D-Darstellung und die Berechnung der Abstände (Å) erfolgten mit PyMol.

Die Abbildung 2.30 A präsentiert eine SAXS-Struktur eines AbrBN-Dimers. Aus dieser Struktur lässt sich eine zweifache Punktsymmetrie (P2) ableiten – wie sie bei einem Dimer auch zu erwarten ist. Es wäre hier zu betonen, dass die SAXS-Struktur im Gegensatz zur NMR-Struktur eine Hydrathülle besitzt und dadurch größer erscheint. Die Hydrathülle des

AbrBN-Dimers macht 49 % des SAXS-Gesamtproteins aus (Tabelle 2.8). Die Abbildung 2.30 B zeigt ein Bindungsmodell des AbrBN-Dimers mit der *abrB8*-DNA (NMR-Struktur von Sullivan *et al.* (2008)), bei dem die Loop-Regionen (LP1' und LP2 bzw. LP1 und LP2') gemeinsam in die große Furche der DNA-Doppelhelix hineinragen. Diese Bewegung der Loops ermöglicht dem AbrB sich bei der Komplexbildung mit der DNA neu zu orientieren. Während diese Loops die H-Brückenbindungen mit dem Phosphatrückgrat ausbilden, gehen die Arginin-Reste der DNA-bindenden Oberfläche (R8 von $\beta 1$, R15 von $\beta 2$, R23 und R24 von $\alpha 1$) spezifische Bindungen mit den Basen ein. Die Abbildung 2.30 (C - D) zeigt zwei Varianten der NMR-Struktur des AbrBN-Dimers, bei denen die Superposition mit der SAXS-Struktur erfolgte. Dabei zeigen die Loops und die DNA-bindende Oberfläche entweder nach unten (C) oder nach oben (D). Bei der zweiten Variante (D) schien die NMR-Struktur besser zu passen, was bei den Drehungen des Molekülkomplexes verdeutlicht wurde. Denn bei der ersten Variante (C) ragten die ungeordneten Strukturelemente (Tyr48 bis Thr53) nach der 90°-Drehung stark heraus.

Tabelle 2.8: Berechnung der *dummy*-Reste der C-terminalen Domänen des AbrB-Tetramers.

*Gesamtreste umfassen *dummy*-Reste und *dummy*-H₂O's. **Die Anzahl der berechneten *dummy*-Reste sollte der AS-Anzahl des Proteins gleich sein (AbrB-Tetramer weist eine AS mehr pro Monomer auf), die sich auf die polymere Form des AbrB bezieht. Die Anzahl an *dummy*-Resten der C-Termini wurde aus dem AbrB-Tetramer und den AbrBN-Dimeren abgeleitet.

Parameter	AbrB-Tetramer	AbrBN-Dimer	2×AbrBN-Dimer	2×AbrBC-Dimer
Gesamtreste*	838	295	590	248
<i>dummy</i> -Reste**	460	150	300	160
<i>dummy</i> -Reste (Monomer)	115	75	75	40

Die Abbildung 2.31 zeigt die mit GASBOR konstruierte SAXS-Struktur des AbrB-Tetramers. Das AbrB-Tetramer ließ eine recht längliche, ellipsoide Struktur (111 Å x 59 Å) erkennen, die auf den ersten Blick eine doppelte Spiegelbild-Symmetrie (Kügelchenmodell, Abbildung 2.31 A) aufwies. Die andere Darstellung verdeutlichte, dass die putativen N-terminalen DNA-bindenden Domänen antiparallel symmetrisch gegenüber lagen und dadurch eine Abweichung von einer Spiegelbildsymmetrie zeigten (Abbildung 2.31 C). Die DNA-bindenden Domänen lagen nicht auf einer Ebene, sondern waren um 8° zueinander leicht gedreht. Die C-terminalen Domänen lagen in einem Winkel von ca. 23,5° zueinander. Die Anzahl an *dummy*-Resten der C-Termini wurden aus dem AbrB-Tetramer und den AbrBN-Dimeren abgeleitet (Tabelle 2.8). Das Strukturmodell (Abbildung 2.31 B) zeigte eine mögliche Anordnung der AbrBN-Dimere innerhalb des AbrB-Tetramers. Aus

dieser Modellierung lässt sich entnehmen, dass die DNA-bindende Oberfläche des AbrB-Tetramers nach außen gerichtet ist.

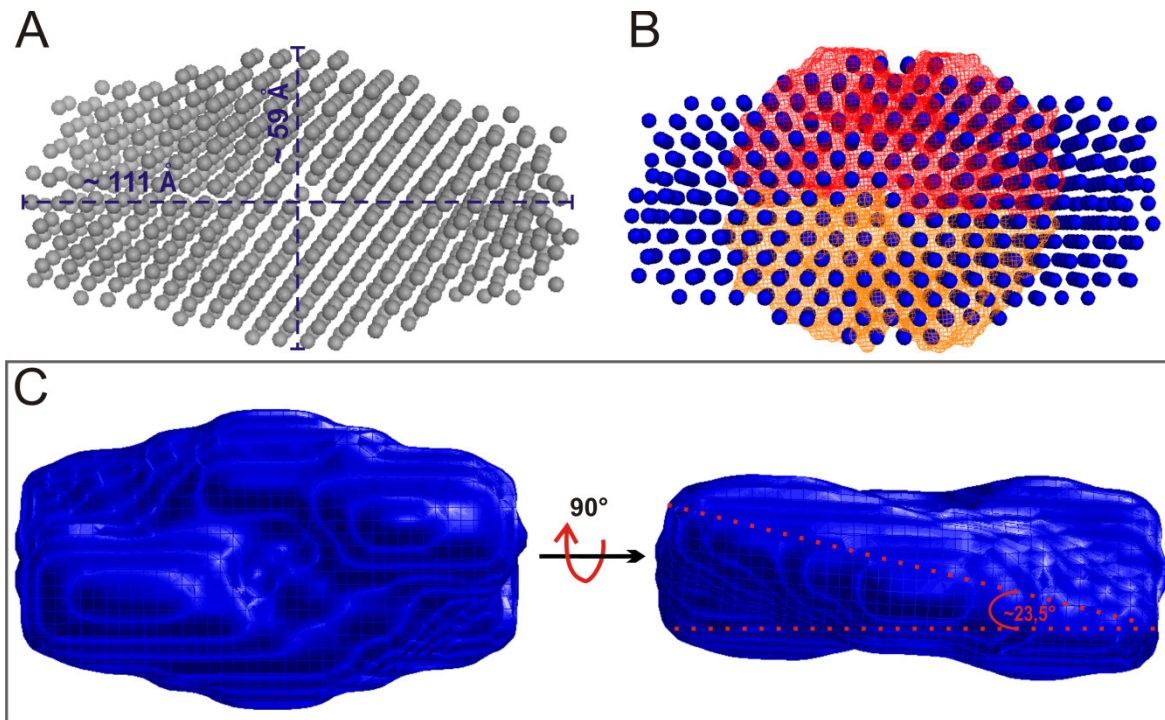


Abbildung 2.31: SAXS-Struktur des AbrB-Tetramers.

(A) Die SAXS-Struktur wurde mittels *ab initio* GASBOR-Programm abgeleitet. Die *dummy*-Reste (insgesamt 460 AS-Reste) sind als Kügelchen dargestellt. (B) Das Strukturmodell zeigt die Superposition der beiden AbrBN-Dimere mit dem AbrB-Tetramer. Die 3D-Darstellung und die Berechnung sowohl der Abstände (\AA) als auch des Winkels und die Modellierung erfolgten mit PyMol. (C) Über die *dummy*-Reste wurden ein Netz (*mesh-wireframe*) und anschließend eine Umhüllung (*surface*) gelegt. Die AbrB-Struktur wurde um 90° gedreht. Die Darstellung des Netzdrahtmodells erfolgte mit RasMol.

2.4.3 SAXS-Struktur von Abba

In der vorliegenden Arbeit gelang es zum ersten Mal die globale Struktur des AbrB-Antirepressors Abba zu ermitteln. Die Abbildung 2.32 A zeigt ein mittels *ab initio*-Methode berechnetes Strukturmodell des Abba-Dimers. Anhand der Struktur lies sich eine zweifache Punktsymmetrie (P2) erkennen. Das Abba-Dimer zeigte eine verlängerte Proteinform ($\sim 66 \text{ \AA} \times \sim 30 \text{ \AA}$), die von der Größenordnung eher dem AbrBN entspräche. Die Abba-Struktur wurde ebenfalls um jeweils 90° gedreht präsentiert.

Die Abba-Struktur wies eine Pseudotandemsymmetrie auf und unterschied sich dadurch stark von der SAXS-Struktur des AbrB-Tetramers. Die Abbildung 2.32 B zeigt das Abba-Dimer aus unterschiedlichen Blickwinkeln (Drehung um die Längsachse). Die seitlichen Arme des Proteins waren nach jeder Drehung unterschiedlich orientiert, auch wenn das Molekül auf den ersten Blick eine Tandemsymmetrie (Darstellung oben) oder eine Spiegelbildsymmetrie (in der Mitte und unten) zu besitzen schien.

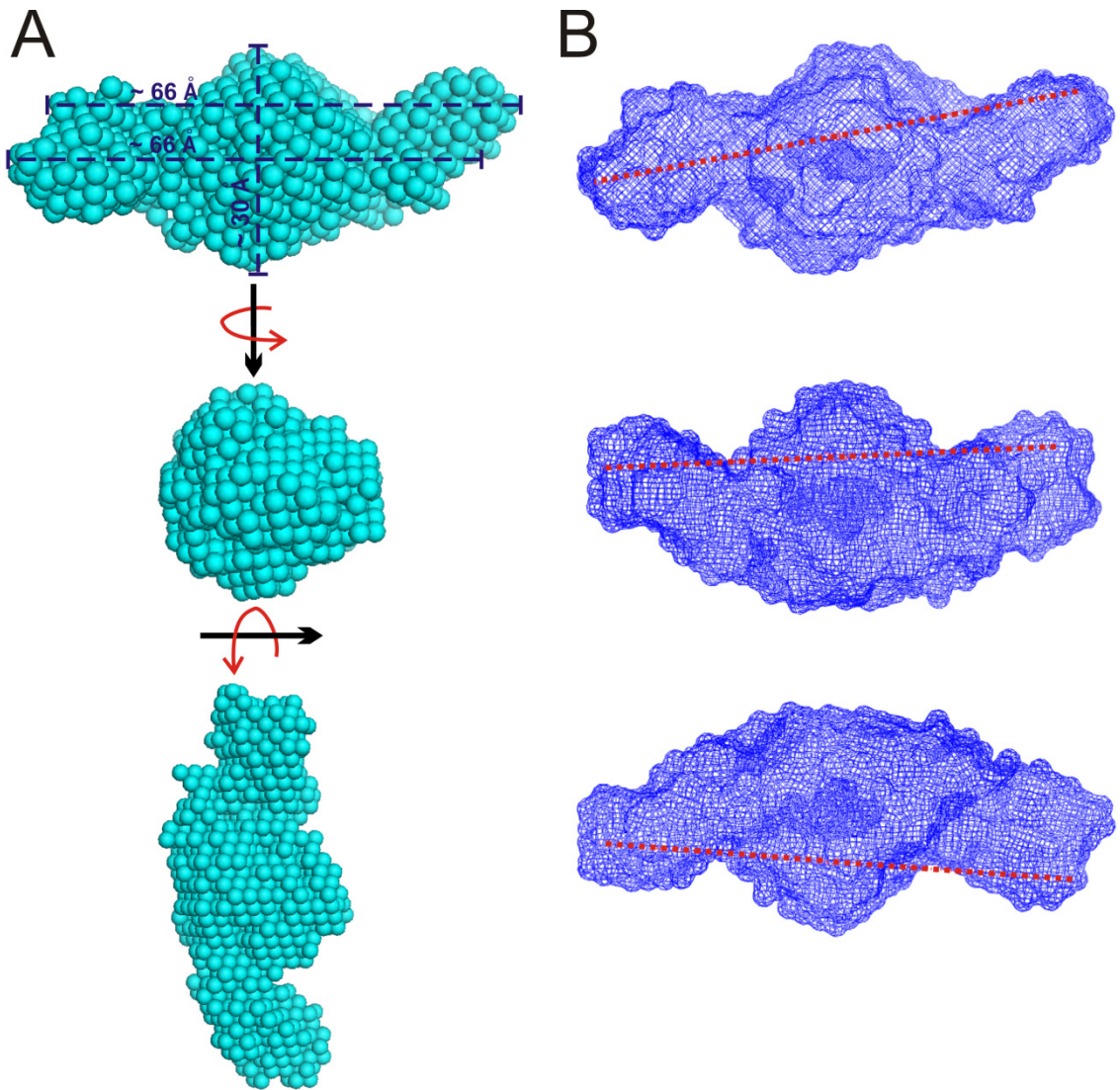


Abbildung 2.32: SAXS-Struktur des AbbA-Dimers.

(A) Die SAXS-Struktur wurde mittels *ab initio* GASBOR-Programm abgeleitet. Die *dummy*-Reste sind als Kügelchen dargestellt. Die Struktur wurde jeweils um 90° gedreht. (B) Über die *dummy*-Reste wurde ein Netz (*mesh*) gelegt. Die Präsentation des AbbA-Dimers aus den unterschiedlichen Blickwinkeln: das Molekül wurde um die Längsachse gedreht. Die rote Linie dient als Hilfslinie, um die Orientierung der Arme verfolgen zu können. Die 3D-Darstellung und die Berechnung der Abstände (Å) erfolgten mit PyMol.

3 Diskussion

3.1 Kernregion innerhalb ABS1 des *phyC*-Gens

Das AbrB-Protein bindet spezifisch an eine Vielzahl von DNA-Bereichen, die heterogene Eigenschaften aufweisen (Strauch *et al.* 1989b, Xu *et al.* 1996b, Bobay *et al.* 2004). Die AbrB-Bindungsstellen (ABSs) variieren in ihrer Größe, ihrer Position relativ zum Transkriptionsstartpunkt, der Anzahl an Bindungsstellen innerhalb eines Promotors und Gens und in der Distanz zwischen den ABSs (Abbildung 1.3).

Trotz der Vielfalt der bekannten DNA-Zielbereiche zeigen die AbrB-Bindungsstellen von *phyC* die höchste Ähnlichkeit zum *tycA*-Gen, das eine Tyrocidin-Synthetase I kodiert (Marahiel *et al.* 1987). Es wurde gezeigt, dass AbrB zwei ABSs des *tycA*-Gens bindet, die in einem Abstand von 204 bp voneinander liegen. Die erste ABS (30 bp) überlappt die – 35 Promotorregion, die zweite ABS (60 bp) ist innerhalb der kodierenden Region lokalisiert und wurde als *leader*-Region bezeichnet, da eine Deletion dieser Stelle eine konstitutive Promotoraktivität von *tycA* zur Folge hatte (Furbass *et al.* 1991a, Furbass *et al.* 1991b). Eine vergleichbare Anordnung der ABSs wurde auch für das *phyC*-Gen ermittelt (Makarewicz *et al.* 2008). Ähnlich wie bei *tycA* verlangt die AbrB-vermittelte Repression der *phyC*-Expression nach der Integrität der beiden ABSs. Basierend auf SPR-Daten, chemischen Interferenz-Footprints und *in vitro* Transkriptionsassays konnte hier gezeigt werden, dass die ABS1 von *phyC* eine Kernregion (– 316 bis – 230; Abbildung 2.10) umfasst, welche die meisten starken Kontaktpositionen zu AbrB aufweist.

Die Transkriptionsregulatoren der AbrB-Familie weisen eine konservierte Struktur der N-terminalen DNA-bindenden Domäne auf, die als *swapped-hairpin β -barrel* genannt wird (Bobay *et al.* 2005, Coles *et al.* 2005). Basierend auf den NMR-Strukturstudien der DNA-bindenden Domäne, sowie den älteren Mutagenese- bzw. Bindungsanalysen, wurde ein Bindungsmodell für die Interaktion von AbrBN mit dem *abrB8*-Promotor vorgeschlagen (Sullivan *et al.* 2008). Diesem Modell entsprechend interagiert AbrB mit einer Seitenfläche der DNA-Helix (Strauch *et al.* 1989b, Furbass *et al.* 1991a) über die positiv geladenen Arginin-Reste R8, R15, R23 und R24. Die Bindung umfasst dabei eine DNA-Windung (große und kleine Furche), die als ein Minimum für eine Interaktion zwischen AbrB und der DNA eingenommen wird (Bobay *et al.* 2004). In ihrem Bindungsmodell schlagen Sullivan und seine Mitarbeiter (2008) vor, dass die δ -Guanidinogruppen der Arginine R15 und R15' mit N7 und O6 der Guanine, sowie mit dem DNA-Phosphatrückgrat, H-Brückenbindungen eingehen. Die Thyminreste sollen dabei auch als bevorzugte Kontaktstellen von R15 dienen (Bobay *et al.* 2006).

Die Methylierung der Guanine an Position N7 lieferte allerdings in dieser Arbeit nur schwache Interferenzmuster für die ABS1 des *phyC*-Gens. Stattdessen konnte ein starker Effekt bei Oxidierungen von G und T durch KMnO_4 auf die Interaktion festgestellt werden. Auch eine Modifizierung von C (an zwei Positionen) und T durch NH_2OH (Abbildung 2.12) beeinflussten die AbrB-Bindung nachhaltig. Die meisten starken Kontaktpositionen waren demnach Guanine > Thymin > Adenin/ Cytosine.

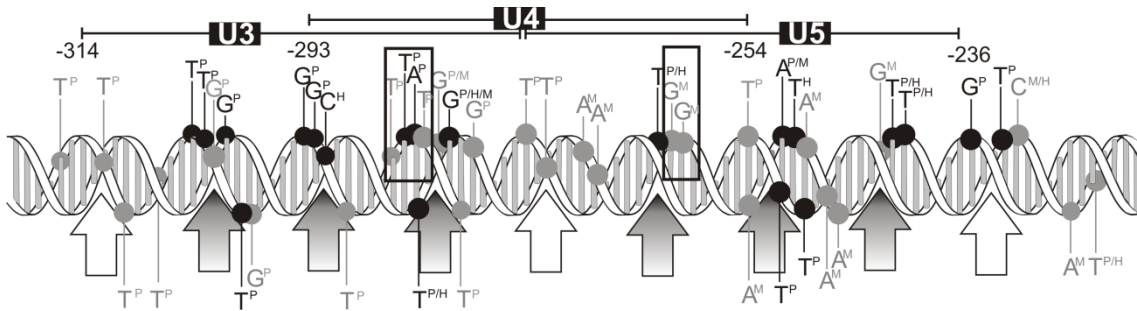


Abbildung 3.1: DNA-Doppelhelix der Kernregion innerhalb der ABS1 von *phyC*.

Die bei der AbrB-Bindung beteiligten Basen wurden mittels Modifikation durch KMnO_4 (P), NH_2OH (H) oder DMS (M) ermittelt. Starke Kontakte wurden als schwarze Punkte und schwache Kontakte als graue Punkte auf der DNA-Helix dargestellt. Die schattierten Pfeile präsentieren die stark bevorzugten AbrB-Bindungspositionen und die weißen Pfeile alternative Positionen. Die umrahmten Positionen zeigen die substituierten Stellen (Abbildung 2.14).

Analog zu dem vorhergesagten Modell (Sullivan *et al.* 2008) wurde in dieser Arbeit auch gezeigt, dass kumulative Kontakte primär auf einer Seite der Helix in einem Abstand, der genau einer Windung entspricht, lokalisiert sind (Abbildung 3.1). Dabei wurden drei Hauptkontaktbereiche zwischen -304 und -280 und drei Hauptkontaktbereiche zwischen -262 und -240 abgeleitet. Diese Bereiche zeigten starke Kontaktpositionen, die zu einer spezifischen Bindung zwischen AS-Resten und den Basen beitragen könnten. Im Gegensatz zu *tycA* liegen alle AbrB-Kontakte innerhalb der Kernregion der ABS1 auf derselben Seite der DNA-Helix.

Die meisten schwachen Kontakte der ABS1-Kernregion wurden *upstream*, *downstream* und zwischen den Hauptkontaktbereichen ermittelt. Diese Kontakte könnten als sekundärer Effekt, durch die Ausbildung von H-Brückenbindungen zwischen den AS-Resten und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA, zustande gekommen sein und somit eine stabilisierende Funktion bei der Bindung mehrerer AbrB-Tetramere an die Kernregion ausüben.

3.2 Konsensus-ähnliche Motive

Obwohl AbrB mit einer Vielzahl von diversen DNA-Targets interagiert (Xu *et al.* 1996b), bindet es seine Targets sehr spezifisch (Strauch *et al.* 1989b, Bobay *et al.* 2004). Mehr als

40 chromosomal lokalisierte AbrB-Bindungsstellen wurden mittels DNaseI-Footprints festgestellt (Xu *et al.* 2001), die jedoch keine erkennbare Konsensus-Sequenz aufweisen (Strauch *et al.* 1989b, Xu *et al.* 1996b). Eine *in silico* genomweite Bindungsanalyse deckte 643 potentielle AbrB-Targets im Genom von *B. subtilis* ab und leitete aus ungefähr 160 starken Bindungsregionen vier verschiedene Hauptbindungsmuster der Sequenzmotive (P01 bis P04) mit unterschiedlichen Spezifitäten und Affinitäten für AbrB/Abh-Homomere und -Heteromere ab (Chumsakul *et al.* 2011). Auffällig häufig waren hier die zwei TGGNA-Motive, die sich in Orientierung und Abstand zueinander unterschieden (P01, P02, P04). Das TGGNA-Motiv wurde schon früher von Xu und Strauch (1996b) aus der *in vitro* Selektion optimaler AbrB-Bindungsstellen abgeleitet. Die Arbeitsgruppe von Chumsakul zeigte allerdings, dass, während das Abh als ein Homomer streng nach dem TGGNA-Motiv verlangt (P01, P04), die TGGNA-abhängige AbrB-Bindung weniger spezifisch sei (Chumsakul *et al.* 2011).

Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass hauptsächlich Thymin und Guanin innerhalb der Kernregion der ABS1 als wichtige Kontaktstellen für die AbrB-Bindung fungieren. Einige Sequenzabschnitte der ABS1 wiesen wenige Ähnlichkeiten mit dem TGGNA-(TNCCA)-Motiv auf: von -295 bis -291 wurde ein aGGcA-Motiv, von -290 bis -286 ein TGGct-Motiv und von -281 bis -277 ein ctCCA-Motiv gefunden. Ferner zeigte eine Sequenz von -263 bis -259 mit TACCA eine Übereinstimmung mit dem invertierten TNCCA-Motiv. Damit kommt das Motiv zwar einzeln innerhalb der Kernregion vor, jedoch wurden keine Paare dieses TGGNA-Motivs, die in einer palindromischen oder Tandem-Orientierung und in einem Abstand von 0 bis 6 bp (A/T) vorliegen (Xu *et al.* 1996b, Sullivan *et al.* 2008), gefunden. Das würde die Annahme unterstützen, dass sowohl die vollständige Übereinstimmung mit dem TGGNA-(TNCCA)-Motiv (Xu, Clark, & Strauch, 1996) als auch die Anzahl an Motivwiederholungen keine bestimmenden Faktoren für die AbrB-Bindung an seine DNA-Zielbereiche sind.

3.3 Kooperativität als allgemeiner Mechanismus?

3.3.1 Kooperativität zwischen AbrB-Bindungsstellen im *phyC*-Gen

Auf Grund der Vielfalt bekannter AbrB-Bindungsstellen ist der Mechanismus der DNA-Bindung durch AbrB noch nicht ganz verstanden. In verschiedenen Studien, die dieser Arbeit vorangingen (Makarewicz 2006, Makarewicz *et al.* 2008, Neubauer 2008), konnte gezeigt werden, dass der AbrB-Bindung mit dem *phyC*-Promotor ein komplexer Mechanismus zur Grunde liegen muss. Die Gelretardationsexperimente erlaubten, aufgrund von deutlichen Komplexzwischenformen, zu postulieren, dass mehrere AbrB-Tetramere in die Bindung mit der *phyC*-Region involviert sein müssten. Auch in anderen

Gelretardationsstudien mit nativen AbrB-Bindungsstellen wurden die Zwischenkomplexe, sowie die Erhöhung der Affinitäten der AbrB-Bindung und des Hill-Koeffizienten ($n_{\text{Hill}} > 2$) mit steigender DNA-Fragmentgröße beobachtet (Strauch 1995c), und somit ein mehrstufiger kooperativer Prozess mit mehr als zwei AbrB-Tetrameren an eine AbrB-Bindungsstelle vorgeschlagen (Strauch 1995c, Sullivan *et al.* 2008). Diese Annahme unterstützen auch die DNaseI-Footprintexperimente, da es höchst unwahrscheinlich erschien, dass ein so ausgedehnter Bereich, wie im *phyC*-Gen, durch ein einziges AbrB-Tetramer vor dem Verdau geschützt ist (Makarewicz *et al.* 2008).

Es konnte eine kooperative Bindung an beiden AbrB-Bindungsstellen für die AbrB-vermittelte Repression von *phyC*, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, gezeigt werden. Zudem erfolgte die Transkriptionshemmung erst in Anwesenheit beider Bindungsstellen (Makarewicz *et al.* 2008). Bislang wurde nur für das *tycA*-Gen von *B. subtilis* ein vergleichbarer Mechanismus und eine ähnliche Struktur der AbrB-Bindungsstellen vorgeschlagen (Furbass *et al.* 1991a, Furbass *et al.* 1991b). Was allerdings vermutlich der Tatsache geschuldet ist, dass bei Weitem noch nicht alle AbrB-Targets bekannt sind und untersucht wurden.

Bei den Analysen zur Interaktion dieser ausgedehnten *phyC*-Promotorregion mit AbrB ließen sich jedoch keine genauen Parameter, wie K_D -Werte oder Hill-Koeffizienten ermitteln, da die Reaktionen einen zu komplexen Bindungscharakter aufwiesen. Dadurch ließen sich weder die Gelretardationsassays, aufgrund der vorhandenen Schmierbanden, quantitativ auswerten, noch die (hier nicht gezeigten) SPR-Daten mit dem 400 bp *phyC*-Fragment als immobilisierter Ligand verwerten.

Aus den Bindungsuntersuchungen und den chemischen Interferenzen lässt sich jedoch postulieren, dass die Kernregion der ABS1 die Interaktion mit einem oder sogar mehreren AbrB-Tetrameren fördert und so kooperativ die AbrB-Tetramere an die ABS2 rekrutiert, wobei ABS2 eine höhere Flexibilität aufweist, da alle ds-Oligonukleotide der ABS2 ähnliche kooperative Eigenschaften aufwiesen.

Diese Tatsache, dass mehrere AbrB-Tetramere kooperativ an den großen AbrB-Bindungsbereich von *phyC* und *tycA* binden, erlaubt zu postulieren, dass auch eine kooperative Interaktion zwischen den AbrB-Tetrameren auftreten könnte. Es ist vorstellbar, dass beide kooperativen Mechanismen bei der Bindung an große DNA-Targets gleichzeitig auftreten könnten. Eine kooperative Wechselwirkung dieser Art, welche vom direkten Kontakt zwischen den Proteinen abhängt, so wie sie auch vom λ -Repressor bekannt ist, erhöht die Affinität für die Bindung des zweiten Proteins an die DNA um das Vielfache (Ptashne 1986). Diese Annahme leitet sich aus den Versuchen mit AbrB-Mutanten ab, die noch fähig waren an *phyC*-Region zu binden, aber keine Zwischenformen der Komplexe

aufwiesen. Damit verloren die substituierten AbrB-Varianten, aufgrund der gestörten Funktionalität der C-terminalen Domänen, das kooperative Bindungsverhalten, das wahrscheinlich auf dem Verlust der AS-Kontaktflächen für Protein-Protein-Interaktionen beruht. Bei dieser Kooperativität könnten die C-terminalen Domänen das AbrB-Tetramer in eine bestimmte stabile Konformation ausrichten, die für optimale Interaktionen zwischen den AbrB-Tetrameren erforderlich sein könnte.

3.3.2 Positive Kooperativität innerhalb des AbrB-Tetramers

Mittels verschiedener innovativer Techniken (SPR, CD) konnte gezeigt werden, dass nicht nur die beiden AbrB-Bindungsstellen in einer kooperativen Beziehung zueinander stehen, sondern auch, dass innerhalb des AbrB-Tetramers eine positive Kooperativität besteht (Neubauer *et al.* 2012).

In dieser Arbeit wurden die ersten Echtzeit-Kinetiken zur DNA-AbrB-Interaktion mittels SPR analysiert. Die Sensorgramme zeigten, dass beide Proteine, AbrB und AbrBN, sehr hohe Affinitäten zu den ds-Oligonukleotiden aus beiden ABSs aufwiesen, da nur eine schwache Dissoziation des Komplexes detektiert wurde (Abbildung 2.2). Der nM-Bereich der thermodynamischen K_D -Werte (Tabelle 2.1) stimmt mit den in älterer Literatur präsentierten K_D -Werten für AbrB-Targets, wie *spo0E*, *aprE*, *sinIR* und *abrB* (Strauch 1995c), gut überein. Die ds-Oligonukleotide konnten aufgrund der unterschiedlichen Bindungseigenschaften (RU_{max} - und n_{Hill} -Werte) in zwei Gruppen (GI und GII) eingeteilt werden. Alle ds-Oligonukleotide der ABS2 und nur eine kleine Region innerhalb der ABS1 (U3 und U4) verursachten bei der Bindung mit AbrB sowohl die Konformationsänderungen im Protein als auch in der DNA (CD-Spektroskopie) und wiesen eine Kooperativität von $2 < n_{Hill} < 4$ mit einer Stöchiometrie von 2:1 (DNA:AbrB-Tetramer) auf. Der Hill-Koeffizient lässt somit auf zwei bis vier kooperative Stellen innerhalb des AbrB-Tetramers schließen. Auf der anderen Seite zeigten die GII-Oligonukleotide eine nicht-kooperative ($n_{Hill} \sim 1$) 1:1-Stöchiometrie bei der Bindung mit dem AbrB-Tetramer, die mit keiner signifikanten Konformationsänderung des Proteins einhergeht.

Die induzierte Konformationsänderung, die sichtlich mit einer positiven Kooperativität innerhalb des AbrB-Tetramers verbunden ist, scheint somit weniger von der Größe des DNA-Targets und mehr von der inhärenten Natur der DNA-Sequenzen abhängig zu sein. Aus diesen Ergebnissen kann man spekulieren, dass die Bindung des ersten GI-Oligonukleotids an eine N-terminale DNA-Bindungsstelle eine Konformationsänderung innerhalb des AbrB-Tetramers induziert und dadurch die Bindung eines weiteren Oligonukleotids an die zweite DNA-Bindungsstelle erleichtert.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die N-terminalen DNA-bindenden Domänen (AbrBN), die funktionelle Dimere ausbilden, selbst keine kooperativen Eigenschaften aufwiesen und eine 1:1-Stöchiometrie zu allen ds-Oligonukleotiden zeigten. Diese Ergebnisse erlaubten zu postulieren, dass die Kooperativität durch die C-terminale Domänen vermittelt wird (Neubauer *et al.* 2012).

Bei Betrachtung der Daten stellt sich die Frage, ob die Kooperativität einen allgemeinen Mechanismus der Erkennung und Bindung an die AbrB-Bindungsstellen darstellt? Andere veröffentlichte Studien zeigen, dass AbrB in der *sinIR*-Promotorregion P1 einen sehr kurzen DNA-Bereich von nur 24 bp erkennt (Shafikhani *et al.* 2002) und ohne sichtbare Zwischenformen der Komplexe daran bindet (Strauch 1995c). Diese Ergebnisse und die aus PsC-SEC- μ ESI-MS ermittelten Daten (Cavanagh *et al.* 2002) deuten auf ein 1:1-Bindungsmodell (1 *sinIR*:1 AbrB-Tetramer) mit einer eher einfachen Bindungskinetik hin, obwohl beide Proteine, AbrB und AbrBN, mit dem *sinIR*-Target einen stabilen und hochaffinen Komplex im Vergleich zu anderen kleinen Erkennungsstellen (*spo0E* und Aptomere) ausbilden (Bobay *et al.* 2004). Damit scheint die Kooperativität zwar ein Charakteristikum für AbrB-Interaktionen mit einigen DNA-Bereichen zu sein, aber nicht der ausschließliche mögliche Mechanismus, was eine hohe Flexibilität des Proteins unterstreicht.

3.4 Hochorganisierte DNA-Strukturen

3.4.1 AbrB – ein Nukleoid-assoziiertes Protein?

Die AT-reichen Sequenzabfolgen führen zu einer intrinsischen Biegung der DNA-Helix. Die beiden ABSs im *phyC*-Gen tragen einen hohen AT-Gehalt zwischen 60 % und 80 % mit mehreren AT-reichen Wiederholungen sowohl in der ABS1 als auch in der ABS2 (Makarewicz *et al.* 2008), die in einem DNA-Modell Krümmungen der Helix verursachen (Abbildung 3.5 und Abbildung 3.2; Munteanu *et al.* (1998)). Das vorhergesagte Modell der ABS1 verdeutlicht, dass entlang der Helix-Achse eine einheitliche Krümmung über einen großen DNA-Bereich (bp-Position - 354 bis - 206) vorliegt, wobei die DNA ab Position - 206 (A₅T₂) stärker gekrümmt wird (Abbildung 3.2). Das Modell der ABS2 wies eine leichte, S-förmige Krümmung entlang der Helix-Achse auf. In bereits veröffentlichten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass gezielte AT:GC-Substitutionen der AT-reichen Abfolgen mit einem Verlust der Repressoraktivität sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einhergehen (Makarewicz *et al.* 2008).

Die AT-reichen Sequenzen, die oft in regulatorischen Regionen der Gene vorkommen (Coll *et al.* 1987), scheinen ein wichtiges Merkmal der AbrB-Bindungsstellen zu sein (Furbass *et al.* 1991a, Strauch 1995b, Makarewicz *et al.* 2008) und zeigen oft eine

ungewöhnliche DNA-Konformation mit den großen Propellerverdrehungen (*propeller twist*), die durch die gabelförmigen (*bifurcated*) H-Brückenbindungen in der großen Furche stabilisiert werden und zusätzlich eine Verengung in der kleinen Furche aufweisen (Coll *et al.* 1987). Die Propellerverdrehung ist eine konformationelle Variation, die eine Gegenrotation der gepaarten Basen um ihre gemeinsame Achse beschreibt (Coll *et al.* 1987, Knippers 2001).

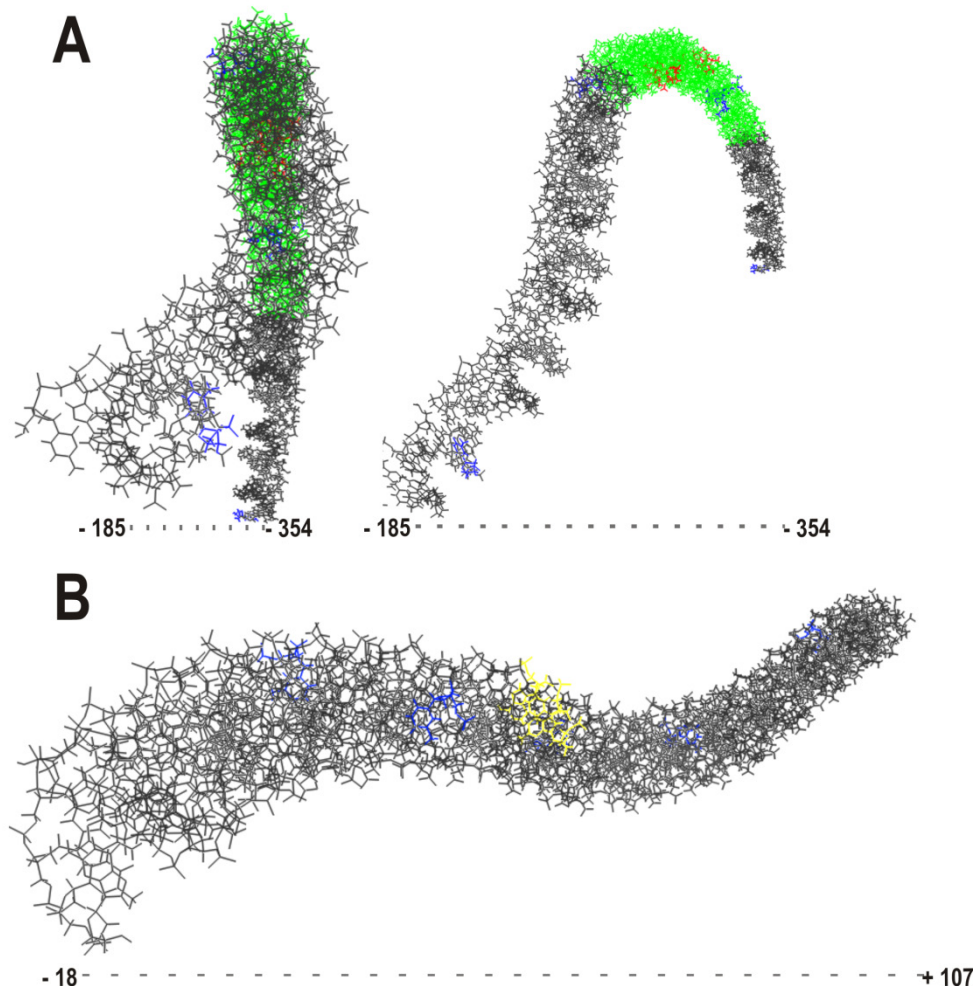


Abbildung 3.2: Vorhersage der intrinsischen Krümmung der DNA-Doppelhelix.

Das dreidimensionale Modell der DNA-Helix wurde mit der *online*-Software http://hydra.icgeb.trieste.it/dna/model_it.html nach Munteanu *et al.* (1998) berechnet. (A) ABS1 und (B) ABS2 sind aus unterschiedlichen Blickwinkeln dargestellt, um die Krümmungen zu verdeutlichen. Die hervorgehobene Kernregion innerhalb der ABS1 (grün) wurde aus den chemischen Footprintassays abgeleitet. Die rot markierten Basen stellen die Substitutionen (34-1 und 34-2; Abbildung 2.14) und die blau markierten Basen die hypersensitiven DNaseI- und KMnO₄-Bereiche dar. Die gelb markierte Stelle innerhalb der ABS2 ist ATG.

Die bekannten AbrB-Bindungsstellen besitzen einen auffallend hohen AT-Gehalt, aber nur einige weisen eine intrinsische Biegung in ihrer DNA-Helixstruktur auf. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass AbrB sowohl gebogene als auch gestreckte DNA bindet, womit eine Biegung der DNA keine Voraussetzung für die AbrB-Bindung zu sein scheint (Strauch 1995b, Strauch *et al.* 1995d).

Bobay und seine Mitarbeiter (2004) haben postuliert, dass die Erkennung der DNA-Zielbereiche durch AbrB in erster Linie auf die Propellerverdrehungen und die Verengung der kleinen Furche zurückzuführen sein könnte. Diese Propeller-Konformation könnte die intrinsische Biegung der DNA-Helix fördern (Coll *et al.* 1987) und damit eine weniger starre Konformation bewirken (Xu *et al.* 1996b). Aufgrund dieser strukturellen Variationen der DNA-Helix wird den AbrB-Bindungsstellen eine inhärente Flexibilität zugeschrieben (Xu *et al.* 1996b, Bobay *et al.* 2004), die der DNA die Fähigkeit verleiht, die Struktur bei der Bindung an AbrB zu verändern (Bobay *et al.* 2004). Diese Eigenschaft wurde in den CD-Experimenten bestätigt (Kapitel 2.3.1), in denen signifikante DNA-Verformung in Gegenwart von AbrB beobachtet werden konnte, wobei die GI-Oligonukleotide stärkere Strukturveränderung aufwiesen. Das lässt vermuten, dass diese Flexibilität tatsächlich das gemeinsame Merkmal der AbrB-Bindungsstellen darstellen könnte.

Die Ergebnisse verschiedener Arbeiten verdichten die Annahme, dass AbrB, in Anbetracht der Vielfalt der DNA-Interaktionsbereiche und der Spezifitäten von AbrB-Bindungen, eher dreidimensionale DNA-Strukturelemente als ein Konsensus-ähnliches Motiv, erkennt (Strauch *et al.* 1989b, Xu *et al.* 1996b, Bobay *et al.* 2004).

In der Studie von Chumsakul *et al.* (2011) konnten 643 spezifische AbrB-Bindungsstellen im *B. subtilis* Genom identifiziert werden, von denen nur 103 einen direkten Einfluss auf die Transkription hatten. Desweiteren waren 58 % der Bindungsstellen innerhalb kodierender Regionen lokalisiert, was die primäre Funktion von AbrB (und Abh) als Transkriptionsregulator relativiert und vermuten lässt, dass es eine Rolle bei der Modulation der Chromatinstruktur haben könnte. Allerdings wiesen die *abrB*-negativen Mutanten keinen auffälligen Phänotyp bezüglich der Chromatinorganisation auf (Chumsakul *et al.* 2011). Es wäre jedoch zu betonen, dass wegen des Wechselspiels (Synergie, Antagonismus und Redundanz der Funktionen) der NAPs normalerweise die Entfernung eines einzelnen Proteins zu keiner deutlichen Phänotypänderung führt (Pul *et al.* 2007). Solche Nukleoid-assoziierten Proteine (NAPs) wurden in *E. coli* zahlreich beschrieben. Bei grampositiven Bakterien hingegen sind nur wenige Vertreter bekannt (Ohniwa *et al.* 2011). Dazu gehören NAPs, wie HBSu (Klein *et al.* 2002) und HPB12 (Arnold-Schulz-Gahmen *et al.* 1994), die in *B. subtilis* gefunden wurden. Die AbrB/Abh-Proteine teilen einige Eigenschaften mit NAPs: niedrige Molekülmassen, eine niedrige Sequenz-Spezifität und AT-reiche Sequenzabschnitte der DNA-Bindung, kooperative Bindung und zahlreiche Bindungsstellen entlang des Genoms (Dame 2005, Pul *et al.* 2007). Eine gegenseitige Abhängigkeit von AbrB/Abh bei der DNA-Bindung wird mit der Eigenschaft des *E. coli* Nukleoid-Proteins H-NS und seines Paralogen StpA verglichen (Chumsakul *et al.* 2011). Somit könnten die AbrB/Abh-Proteine eine neue Spezies von

Nukleoid-assoziierten Proteinen in *Bacillus*-Arten präsentieren. Der Effekt einer fast ausschließlich negativen Regulation durch AbrB könnte somit ein Nebeneffekt sein, wenn sich die Bindungsstelle innerhalb oder in der Nähe eines Promotors befindet.

Ein weiterer Hinweis auf die NAP-Funktion des AbrB-Proteins konnte in einer Bachelorarbeit (Shakola 2010) in der AG Bakteriengenetik (HUB) gezeigt werden: Eine Verkürzung der nicht-gebundenen Zwischenregion, die sich zwischen den beiden ABSs des *phyC*-Gens befindet (Abbildung 7.21), führte zu einer reduzierten Bindungsfähigkeit von AbrB an die *phyC*-Region. Dies könnte ein Hinweis auf die Ausbildung einer DNA-Schleife sein. Solche Schleifen werden durch die Wechselwirkungen von gebundenen NAPs mit der DNA ausgebildet (Pul *et al.* 2007, Wolf *et al.* 2007). Scheinbar müssen die beiden ABSs so angeordnet sein, dass eine spannungsfreie Biegung der DNA ermöglicht wird. Sullivan und seine Mitarbeiter (2008) haben ein Bindungsmodell vorgeschlagen, bei dem ein AbrB-Tetramer gleichzeitig zwei entfernte DNA-Bereiche bindet und dadurch eine 40-50 bp lange DNA-Schleife verursacht (Ptashne 1986, Schleif 1987, Schleif 1992, Nakano *et al.* 1993). Diese Art der Bindung verlangt einen 60-70 bp großen geschützten Bereich beim DNaseI-Verdau (Sullivan *et al.* 2008). Einige bekannte AbrB-Bindungsstellen liegen in diesem Größenbereich und sogar höher (*rbs*, *yknW*, *abrB*, *comK*, *aprE* und *phyC*; Abbildung 1.3). Die meist bekannten AbrB-Bindungsstellen liegen allerdings im Größenbereich zwischen 25 und 45 bp, was dafür spricht, dass die bei der AbrB-Bindung verursachte, hypothetische Schleifenbildung keine Voraussetzung sein muss.

Die chemischen Interferenz-Footprints zeigten einige abgeschwächten Guanin-Positionen auch in den proteinfreien DNA-Proben (Abbildung 2.12). Die B-Form der DNA-Helix ist für die KMnO₄-Modifikation unempfindlich, deshalb wird die DNA vor der Behandlung denaturiert. Es ist bekannt, dass einige Basen durch KMnO₄ schwächer modifiziert, und dadurch als abgeschwächte Banden auf dem Gel sichtbar werden, was auf eine Veränderung der Sekundärstrukturen an diesen Stellen zurückzuführen ist (Rubin *et al.* 1980). So lassen sich aus der Bandenstärke der Kontrollprobe einige Informationen über die Struktur der DNA ableiten. Dieser Effekt deutet damit auf eine Verformung der *phyC*-DNA in der Kernregion der ABS1 hin. Auch die ABS2 wies eine Verformung der DNA-Struktur auf, was durch die fünf DNase-hypersensitiven Stellen sichtbar wurde (Makarewicz *et al.* 2008).

3.4.1.1 Triplex-Strukturen als Motiv?

Interessante Ergebnisse zeigten auch die *in vitro* Transkriptionsassays. Auch ohne das Repressorprotein AbrB konnte ein hemmender Effekt auf die Transkription des *phyC*-Gens beobachtet werden, wenn das freie ABS1-Fragment hinzu gegeben wurde, was auf eine

komplexe Strukturverformung zwischen der ABS2 und der Kernregion von ABS1 hinweisen könnte. Es ist vorstellbar, dass sich eine Triplex-DNA zwischen ABS2 und einem der Stränge der Kernregion ausbildet. Diese Annahme ist hier rein spekulativ und müsste mit weiteren Experimenten unterlegt werden. Allerdings wurde bei Eukaryoten die Ausbildung von Triplex-helikalen DNA-Motiven bei unterschiedlichen biologischen Prozessen beobachtet (Buske *et al.* 2011). Auch bei Bakterien kennt man das Tn7-kodierte Protein, TnsC, das selektiv ein Pyrimidin-Motiv der DNA-Triplex erkennt und die spezifische Insertion des Transposons einleitet (Rao *et al.* 2001). Im Gegensatz zur Duplex-DNA besitzt die Triplex-DNA eine relativ hohe Ladungsdichte. Deshalb verlangt die durch Triplex-DNA verstärkte DNA-Kompaktierung nach partieller Ladungsneutralisierung, die durch eine spezifische, begünstigte Bindung von Polyaminen an das Triplex-Motiv erfolgen könnte (Goobes *et al.* 2002). AbrB-ähnliche Proteine besitzen einen hohen Anteil an basischen AS-Resten (15 im AbrB), welche die stark negative Ladung der Triplex-DNA abdecken dürften.

Die hier präsentierten Ergebnisse erlauben zu postulieren, dass AbrB viel höhere Ordnungen der DNA-Strukturen erkennt oder sogar diese fördert. Anscheinend sind diese von einer komplexeren Natur, als die bisher vorgeschlagenen lokalen DNA-Topologien (Bobay *et al.* 2004). Die Funktion als ein neues Nukleoid-assoziiertes Protein bei grampositiven Bakterien erschien deshalb als sehr wahrscheinlich.

3.5 Vielfache Funktionen der C-terminalen Domäne

3.5.1 DNA-bindende Aktivität?

Die vorangehenden Studien zeigten bereits, dass die DNA-Erkennung und Spezifität auf die N-terminalen AbrB-Domänen zurückzuführen sind (Xu *et al.* 2001, Bobay *et al.* 2004). Die dimere Struktur der DNA-bindenden Domänen stellt die minimalen strukturellen Voraussetzungen für eine *in vitro* DNA-Bindung dar (Benson *et al.* 2002, Bobay *et al.* 2004). Für die *in vitro* Funktionalität des nativen Proteins sind allerdings ebenso die C-terminalen Domänen eine Voraussetzung, was aus einigen Mutations- und Deletionsanalysen des C-Terminus (C54S, C54W, L67P, N64P und Q81ter) und daraus resultierenden Aktivitätsveränderungen abgeleitet wurde. Denn diese Mutationen haben sowohl die Polymerisierungsfunktion, als auch die *in vitro* Bindungsaktivität von AbrB an seinen natürlichen *spo0E*-Zielgen reduziert (Xu *et al.* 1996a, Yao *et al.* 2005).

Den Einfluss der C-terminalen Domänen auf die DNA-bindende Aktivität von AbrB zu untersuchen, war eines der Ziele dieser Arbeit und von wichtiger Bedeutung, um den Bindungsmechanismus besser zu verstehen. So wurden im C-Terminus polare Aminosäurereste substituiert (Abbildung 1.5) und die Funktionalität der erzeugten AbrB-

Varianten mit den natürlich vorkommenden AbrB-Proteinen aus *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens* an zwei unterschiedlichen DNA-Bereiche (440 bp *phyC* und 36 bp *sinIR*), verglichen.

Es ist bekannt, dass das AbrB-Protein nur als Tetramer funktionell ist (Bobay *et al.* 2004). Die Analyse der Polymerisierungsformen (Abbildung 2.17) zeigte, dass die Alanin-Substitutionen keine signifikanten Veränderungen in der AbrB-Tetramerisierung verursachten, was eine Voraussetzung war, um den Einfluss dieser AS-Positionen auf die DNA-Bindungsaktivität zu untersuchen. Nur einige der Substitutionen (Q55E, Q81E, K94I und E77A, E80A) verursachten relativ große Abweichungen in der Verteilung der polymeren Formen. Außerdem zeigten diese Mutanten eine veränderte Bindungsfähigkeit an die *phyC*-Promotorregion, was darauf hinweisen könnte, dass eine Proteinaggregation die Bindung des AbrB-Proteins an die DNA beeinträchtigte, was die Annahme unterstützt, dass die Integrität der tetrameren Proteinstruktur für eine stabile DNA-Bindung notwendig ist (Yao *et al.* 2005). Interessanterweise lieferte die Substitution K94I im Gegensatz zu K94A eine nur geringfügig verschlechterte Bindungsaktivität. Der Grund dafür könnte die lange Seitenkette der Aminosäure Isoleucin sein, die der Größe der Lysin-Seitenkette ähnelt und somit die Funktion des Lysin-Restes zum Teil übernehmen könnte.

Die AbrB-Mutanten, die eine stabile tetramere Form aufwiesen, zeigten im Vergleich zu WT-AbrB-Proteinen unterschiedliche Bindungseigenschaften. Einige der Aminosäure-Substitutionen reduzierten die Bindungsaktivitäten zu der *phyC*-Promotorregion, andere hingegen gingen mit einem kompletten Bindungsverlust einher. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die substituierten AS-Reste der C-terminalen Domäne die intrinsische DNA-bindende Aktivität von AbrB veränderten.

Jedoch verloren alle substituierten AbrB-Proteine, die das *phyC* noch binden konnten, überraschend die Fähigkeit an die AbrB-Bindungsstelle von *sinIR* zu binden. Dies spricht dafür, dass der AbrB-Bindung an unterschiedliche DNA-Zielbereiche unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen könnten. Wie im Kapitel 3.3.2 ausführlich beschrieben, geht AbrB mit der *sinIR*-ABS eine einfache Bindung ein. Interessanterweise wurde nur ein geringer Unterschied in der Sekundärstruktur von AbrBN im Vergleich zum nativen AbrB gezeigt und dadurch vorgeschlagen, dass das Fehlen der C-terminalen Domäne die Bindungsaffinität gegenüber dem *sinIR*-Gen nicht beeinflusste (Bobay *et al.* 2004).

Diese Daten erlauben zu postulieren, dass die Bindung an die kurze DNA-Sequenz, wie *sinIR*, keine kooperative Interaktionen des C-Terminus verlangt, aber dafür die richtige Konformation der N-terminalen DNA-bindenden Domänen. Es ist deshalb vorstellbar, dass die Konformation der DNA-bindenden Domäne, durch die innerhalb des C-Terminus eingeführten Substitutionen, stark beeinflusst wurde und somit die Bindung an das *sinIR*-

Gen komplett aufgehoben hat. Das Bindungsverhalten gegenüber den beiden heterogenen DNA-Fragmenten scheint somit von den C-terminalen Domänen stärker beeinflusst zu sein, als in früheren Literaturen angenommen wurde.

3.5.2 Interagiert der C-Terminus von AbrB direkt mit der DNA?

Gemäß den Analysen von Luscombe und seinen Mitarbeitern (2001) unterliegen die Protein-DNA-Interaktionen den allgemeingültigen Regeln. Arginine (R) und Lysine (K), sowie auch Asparagine (N) und Glutamine (Q), sind hauptsächlich an der Ausbildung von H-Brückenbindungen, Van-der-Waals-Kräften und Wasser-vermittelten Kontakten, in erster Linie mit den Basen aber auch zu dem Zucker-Phosphatrückgrat der DNA, beteiligt. Auch Aspartat (D) und Glutamat (E) sind dafür bekannt, als multiple Akzeptoren mit den DNA-Basen in der großen Furche komplexe Interaktionen einzugehen. Unabhängig von der Familie der DNA-bindenden Proteine tragen die Interaktionen von Argininen und Lysinen mit den Guaninen, so wie von Glutaminen und Asparaginen mit den Adeninen, stark zu der universalen Spezifität von DNA-Bindungen bei. Weshalb es nicht überraschend war, dass innerhalb der N-terminalen DNA-bindenden Domäne von AbrB vier hochkonservierte Arginine und sieben Lysine vorkommen. Laut Literatur sind Arginine für die DNA-bindende Aktivität des AbrB-Proteins entscheidend (Bobay *et al.* 2005). Damit übereinstimmend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die AbrB-Bindung stark gestört wurde, wenn bestimmte Guanine chemisch modifiziert wurden.

Die AbrB-Sequenzanalyse von *Bacillus*-verwandten Arten (Abbildung 1.5) zeigte innerhalb der C-Termini nur ein komplett konserviertes Lysin (K71), sowie ein Glutamat (E59) und ein Asparagin (N64). Ferner kommen im C-Terminus einige relativ gut konservierte Reste, wie Glutamine (Q55, Q87), Glutamate (E77, E80, E85), ein Aspartat (D62) und ein Lysin (K94), sowie weniger konservierte Aminosäuren (K76, Q81, N88, Q89 und Q91), aber kein konserviertes Arginin vor (Abbildung 1.5). Die Substitutionen der in dieser Arbeit ausgewählten AS-Reste verursachten eine veränderte Funktionalität des AbrB-Proteins.

Die meisten Wechselwirkungen von DNA und Proteinen sind nicht an der Spezifität der Interaktion beteiligt, sondern unterliegen der Stabilität des Komplexes (Luscombe *et al.* 2001). Die H-Brückenbindungen zwischen den AS-Resten und dem Zucker-Phosphatrückgrat der DNA erfolgen unabhängig von der DNA-Sequenz und könnten daher eine Rolle bei der Erkennung unterschiedlicher DNA-Strukturelemente spielen (Luscombe *et al.* 2001). Diese Art von Wechselwirkungen könnten besonders bei der AbrB-DNA-Interaktion von Bedeutung sein, da AbrB lokale DNA-Strukturen eher als eine DNA-Sequenz erkennt (Xu *et al.* 1996b, Bobay *et al.* 2004).

Infolgedessen ist es vorstellbar, dass einige der polaren AS-Reste des C-Terminus von AbrB, direkt in die DNA-Interaktion involviert sein könnten und dadurch die Bindungsstabilität zwischen AbrB und der DNA erhöhen.

3.5.3 Verleihen die C-Termini dem AbrB-Tetramer die Flexibilität?

Bislang existiert keine hochaufgelöste Proteinstruktur des gesamten AbrB. Die unternommenen Versuche, das AbrB-Protein zu kristallisieren, waren bislang erfolglos, was auf die starke Beweglichkeit der C-terminalen Domäne hinweist. Bis jetzt wurde behauptet, dass die kurze C-terminale Domäne eine stark ungeordnete Struktur aufweist (Coles *et al.* 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand der CD-Analyse gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne, zusätzlich zu ungeordneten Strukturen, auch fest definierte Sekundärstrukturelemente aufweist.

Allerdings, konnte die Kristallstruktur des gesamten SpoVT-Proteins, das zur Gruppe der AbrB-ähnlichen Proteine gehört, aufgelöst werden. Sie zeigte, dass die C-terminale und die N-terminale Domäne über einen Linker verbunden sind. Dieser Linker stellt einen flexiblen Teil der Proteinstruktur dar, der die Mobilität und die potentielle Verschiebung der Domänen relativ zueinander ermöglicht (Asen *et al.* 2009).

Aus den *in silico* Bindungsstudien von Chumsakul *et al.* (2011) wurde für das AbrB/Abh-Tetramer postuliert, dass nur eine gewisse Flexibilität der Proteinstruktur die Ausprägung von unterschiedlichen Konformationen und damit die veränderten Bindungsspezifitäten und Eigenschaften ermöglicht (Chumsakul *et al.* 2011).

Es wäre also denkbar, dass solch ein flexibler Linker analog dem SpoVT-Protein, im vorderen Teil des C-Terminus von AbrB liegen könnte. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse der Substitutionen Q55A/ Q55E, D62A und K71A unterstützt, die mit deutlichen Funktionseinschränkungen bis hin zum Bindungsverlust des Proteins einhergingen.

Das SpoVT-Tetramer ist asymmetrisch und zeigt eine antiparallele Anordnung der asymmetrischen Dimere (Asen *et al.* 2009). Der flexible Linker kommt dabei nur in Monomer A und C vor und umfasst eine kleine α -Helix (6 AS). Aus den hier präsentierten CD-Daten konnte dem C-Terminus von AbrB auch ein helikaler Anteil (12 AS) zugeordnet werden. Die SAXS-Struktur zeigt ein symmetrisches AbrB-Tetramer (Abbildung 2.31), damit könnte ein Linker in jedem Monomer vorkommen. Ferner sind die C-terminalen Domänen zueinander gedreht, was dem AbrB-Tetramer eine strukturelle Flexibilität verleihen könnte.

Die Flexibilität der C-Termini könnte die N-terminalen Domänen in die richtige Konformation bringen, um abhängig von dem inhärenten DNA-Zielbereich, eine optimale

Interaktion zu erreichen. Ferner könnte diese auch beim Ausrichten und Stabilisieren des AbrB-Tetramers in eine Konformation, die für die optimalen Interaktionen zwischen den AbrB-Tetrameren erforderlich ist, eine Rolle spielen.

3.6 Neue Rolle des konservierten Arginin-Restes R15

Ein überraschendes Ergebnis der Substitutionsanalyse war, dass die R15A-Mutante, nicht wie erwartet, die Fähigkeit an die *phyC*-Promotorregion zu binden, verloren hat, stattdessen aber eine mögliche Rolle des Arginins R15 während des Tetramerisierungsprozesses erkennbar wurde. Arginin-Reste R8, R15, R23 und R24 liegen auf einer Fläche innerhalb oder um das zentrale $\beta 2/\beta 2'$ -Faltblattpaar, und sollen entscheidend für die DNA-bindende Aktivität des AbrB-Proteins sein (Bobay *et al.* 2005).

In dieser Arbeit zeigte die AbrB-R15A-Variante, im Vergleich zum WT-AbrB und anderen AbrB-Mutanten, starke Abweichungen in den Tyrosin-Fluoreszenzspektren. Diese Mutation hat den Ionisierungszustand des Tyrosin-Restes stark beeinflusst (Abbildung 7.22), was durch die Verschiebung des Maximums zu 340 nm (Tyrosinat) sichtbar wurde (Lakowicz 1999).

In NMR-Studien wurde gezeigt (Sullivan *et al.* 2008), dass R15-Reste so positioniert und orientiert sind, dass sie beim AbrBN die Verbindungsstelle der Dimerisierung zwischen $\beta 2$ und $\beta 2'$ überqueren und gegenüber der Oberfläche liegen, die einen Tyrosin-Rest (Y37) aufweist. Interessanterweise wurde dem Y37-Rest eine Funktion bei den Interdomäneninteraktionen (N- und C- oder C- und C-terminalen Interaktionen) zugeschrieben. Außerdem zeigte AbrBN, im Vergleich zu den beiden paralogen Proteinen (AbhN und SpoVTN), eine Abweichung in der elektrostatischen Oberfläche, die durch R15 verursacht wird (Sullivan *et al.* 2008). Es ist deshalb vorstellbar, dass die Substitution an der Position R15 (R15A) die elektrostatische Oberflächenspannung von AbrB verändert und eine Auswirkung auf Tyr37 und somit auf die Multimerisierung hat.

Die Bedeutung von Tyrosin bei N- und C-terminalen Interaktionen wurde schon von Bobay *et al.* (2004) vorgeschlagen. Fluoreszenzanalysen lieferten den ersten Einblick zur Orientierung der N- und C-Termini zueinander. Dabei könnte die C-terminale Domäne mit einem der beiden Tyrosin-Reste, welche auf dem β -Faltblattgerüst der N-terminalen Dimerisierungszone liegen (Y37 auf $\beta 3$), in Kontakt stehen.

3.7 Kompetitive Hemmung der *phyC*-AbrB-Interaktion

Ein Antirepressor kann auf unterschiedlichen Wegen den korrespondierenden Repressor inaktivieren. Dazu gehört auch eine direkte Interaktion des Antirepressors mit der DNA-bindenden Domäne des Repressorproteins (Navarro-Avilés *et al.* 2007). In den

SPR-Experimenten wurde gezeigt, dass die DNA-Bindung an AbrB so stark war, dass nur eine hohe Salzkonzentration, die bekanntermaßen die Doppelhelix stabilisiert und entspannt, die DNA vom Protein abzulösen vermochte. So stellte sich die Frage, wie das AbrB-Protein *in vivo*, wenn es an sein Ziel-Gen gebunden hat, wieder abgelöst wird. Eine Antwort lieferte vor kurzem die Arbeit von Banse *et al.* (2008): ein Antirepressor, AbbA, wurde entdeckt, der wahrscheinlich das AbrB von der DNA verdrängt.

Anhand der hier präsentierten *in vitro* Bindungsuntersuchungen kann abgeleitet werden, dass AbbA als ein Kompetitor der DNA fungiert und konzentrationsabhängig den Transkriptionsrepressor AbrB von der *phyC*-DNA verdrängt (Gelretardationsassays), wobei die DNA und AbbA um dieselbe Bindungsstelle im AbrB-Tetramer konkurrieren (CD, SPR). Diese Annahme wird auch durch die fehlende Komplexbildung zwischen dem Antirepressor AbbA und AbrB nach Substitution des R15-Restes, der auf der DNA-bindenden Oberfläche liegt, bestätigt. Eine AbrB-Verdrängung von *phyC* durch eine Interaktion von AbbA mit der DNA konnte ausgeschlossen werden. Die schnelle Auflösung des AbrB BA-DNA-Komplexes, ohne die sichtbaren Zwischenformen, im Gegensatz zu AbrB BS, deutete darauf hin, dass AbbA ein starker Kompetitor ist. Diese Annahme wurde mittels nativer Gelelektrophoreseanalyse bestätigt, bei der eine gesättigte, stabile AbrB-AbbA-Bindung, sowohl für die Proteine aus *B. subtilis* als auch aus *B. amyloliquefaciens*, gezeigt wurde.

Die Kinetik der AbrB-AbbA-Interaktionen zeigte ebenfalls, dass die C-terminalen Domänen für die Konformationsänderungen innerhalb des AbrB-AbbA-Komplexes und die daraus resultierenden kooperativen Effekte erforderlich zu sein scheinen. Die Notwendigkeit der C-Termini wurde auch unter den nativen Gelbedingungen bestätigt, denn zwischen AbbA BS und AbrBN wurde eine schwache Komplexbildung beobachtet. Ein weiterer Hinweis darauf war die K76A-Substitution innerhalb des C-Terminus, denn AbrBK76A bildete im Gegensatz zum WT-AbrB mit AbbA einen instabilen Komplex.

Vor kurzem wurde von Leon und seinen Mitarbeitern (2010) eine interessante Entdeckung zur Struktur und Funktion des Antirepressors CarS aus *Myxococcus xanthus* gemacht. CarS imitiert die Operator-DNA und interagiert dabei mit hoher Affinität mit der DNA-Erkennungshelix (*winged*-Helix $\alpha 2$) des Repressors CarAN, wodurch der DNA-CarAN-Komplex aufgelöst wird. Die interagierende $\alpha 2$ -Oberfläche des CarS-Antirepressors ist in der Form, der Größe und der Ladung der Operator-DNA ähnlich. Es ist deshalb vorstellbar, dass der AbrB-Antirepressor AbbA eine ähnliche Funktion ausübt. AbbA-Proteine aus *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens* FZB45 haben, ähnlich dem CarS, einen sehr hohen Anteil an sauren Aminosäuren (insgesamt 12; theoretischer IEP $\sim 4,5$ für AbbA ohne His-Tag). Die AbbA-Sequenzanalyse von verwandten Spezies (Abbildung 1.2) zeigte sechs

komplett konservierte Glutamate und Aspartate (D38, D47). Die Form und die Größe der groben SAXS-Struktur des gesamten AbbA-Dimers entsprechen einer verformten DNA-Doppelhelix. Aus dem vorgeschlagenen Modell (Abbildung 3.3) könnte der mittlere Teil von AbbA eine große Furche der Duplex-DNA und die beiden seitlichen Arme die flexible, verformte DNA-Struktur darstellen. Es ist nicht auszuschließen, dass AbbA die Triplex-Struktur der DNA nachahmen könnte, obwohl dieses Modell rein spekulativer Natur ist. Weitere Experimente wären deshalb nötig, um diese Annahme zu belegen oder zu widerlegen.

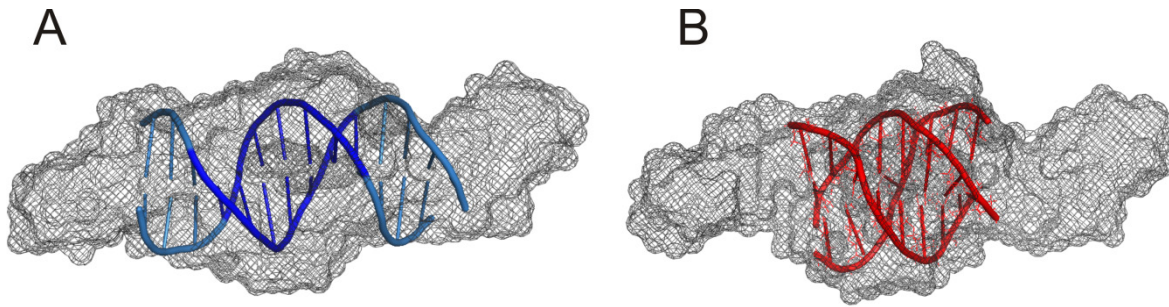


Abbildung 3.3: Modell zur Superposition des AbbA-Dimers mit der Duplex-DNA (A) und der Triplex-DNA (B).

Die Duplex-DNA ist das 14 bp lange Fragment aus der ABS2 (Position +22 bis +35). Die Triplex-DNA entstammt der Arbeit von Sorensen *et al.* (2004).

In der vorliegenden Arbeit konnten einige Erkenntnisse zur Kinetik der AbrB-AbbA-Interaktion erlangt werden. Diese weist eine negative Kooperativität auf. Ein gut bekanntes Beispiel für eine negative Kooperativität ist das Insulinrezeptor-Dimer. Dieses bindet zuerst ein bivalentes Insulinmolekül mit hoher Affinität und erst nach der Absättigung ein weiteres Molekül mit niedriger Affinität (Christoffersen *et al.* 1994). Wie im Fall der Insulin-Bindung (De Meyts *et al.* 2002), wurde auch bei den Interaktionen zwischen *full-length* AbrB und AbbA, ein kurvenlinearer Scatchard-Plot beobachtet, der ein starkes Indiz für eine negative Kooperativität darstellt und auf die Koexistenz von hoch- und niedrigaffinen Bindungsstellen innerhalb des AbrB-Tetramers hinweist. Die abgeleiteten Hill-Koeffizienten für die AbrB-AbbA-Interaktion von 0,75 bzw. 0,89 unterstützen diese Annahme, dass die erste Bindung des bivalenten AbbA-Dimers an das AbrB mit hoher Affinität erfolgt und eine Konformationsänderung innerhalb des AbrB-AbbA-Komplexes verursacht, wodurch die Affinität der zweiten Bindungsstelle für AbbA gesenkt wird. Ein starker Hinweis auf die negative Kooperativität ist die beschleunigte Dissoziation (RU (%) als Funktion der Zeit (sec) der Dissoziationsphase, Daten hier nicht gezeigt), die allerdings nur bei der AbrB-AbbA-Bindung aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 beobachtet wurde. Dieser Effekt wurde auch bei der Insulinrezeptor-Insulin-Interaktion beobachtet (De Meyts 1994). Das ist ein Hinweis, dass die Bindung des zweiten AbbA-Moleküls an AbrB eine Dissoziation des erstgebundenen AbbA zufolge haben könnte. Da

bei höheren Konzentrationen (ab $1\ \mu\text{M}$) die beschleunigte Dissoziation nicht mehr beobachtet wurde, deutet es darauf hin, dass dann beide Bindungsstellen innerhalb des AbrB-Tetramers durch AbbA besetzt sind (Abbildung 3.4).

Das könnte auch erklären, weshalb eine so hohe Menge an AbbA-Dimer notwendig war ($1\text{ AbrB}_4:4\text{ AbbA}_2$), um den AbrB_4 -DNA-Komplex aufzulösen. Gemäß den Struktur- und Funktionsanalysen von De Meyts (2004) lassen sich alle wichtigen Parameter der negativen Kooperativität gut durch die Existenz von zwei Rezeptor-Bindungsstellen erklären, die antiparallel symmetrisch angeordnet sind. Damit übereinstimmend weist die SAXS-Struktur des AbrB-Tetramers ebenfalls eine solche Anordnung der DNA/AbbA-Bindungsstellen auf.

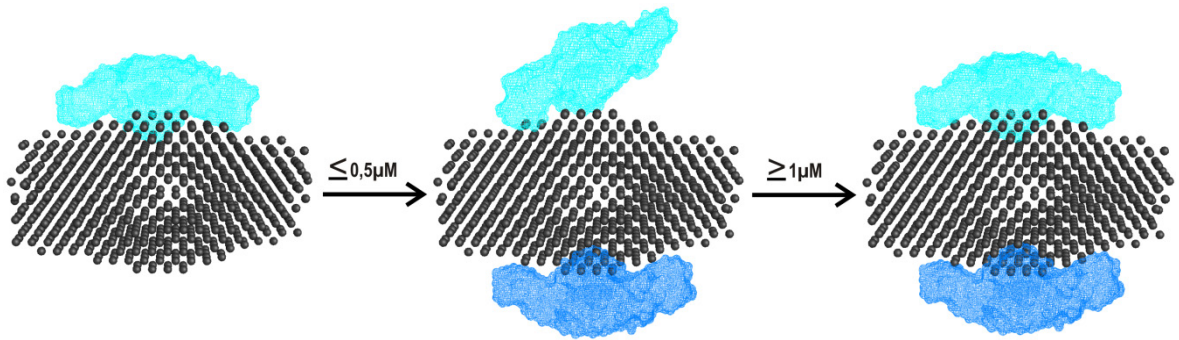


Abbildung 3.4: Modell zum AbrB-AbbA-Bindungsmechanismus.

Das bivalente AbbA-Molekül bindet mit hoher Affinität an die erste Bindungsstelle des symmetrischen AbrB-Tetramers. Bei erhöhter AbbA-Konzentration (bis $0,5\ \mu\text{M}$) erfolgt eine beschleunigte Dissoziation, bei der das zweite AbbA-Dimer das Ablösen des erstgebundenen AbbA-Dimers verursacht. Bei hoher AbbA-Konzentration (ab $1\ \mu\text{M}$) sind beide antiparallel angeordneten Bindungsstellen durch die AbbA-Moleküle besetzt.

3.8 Modell zur Regulation der *phyC*-Transkription

Sullivan *et al.* (2008) lieferten eine hochaufgelöste NMR-Struktur der N-terminalen DNA-bindenden Domänen der drei parologen Proteine AbrB, Abh und SpoVT. Bislang sind keine Strukturen für das AbrB-Protein im Komplex mit der DNA ermittelt worden, deshalb beruhen alle bis jetzt vorgeschlagenen Modelle zur DNA-AbrB-Bindung auf reinen Vermutungen. In diesem Kapitel wird ein mutmaßliches Bindungs- und Verdrängungsmodell zur Regulation der *phyC*-Transkription aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 vereinfacht dargestellt (Abbildung 3.5). Dieses Modell konnte anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse abgeleitet werden.

Über zwei DNA-bindende Domänen könnte das AbrB-Tetramer mit zwei DNA-Bereichen simultan wechselwirken. Die simultane, kooperative Bindung mehrerer AbrB-Tetramere an beiden AbrB-Bindungsstellen (ABS1 und ABS2) hemmt die Transkription des *phyC*-Gens, da die PhoP-Bindungsstellen nicht mehr zugänglich sind und so der PhoP~P-Aktivator nicht mehr binden kann. Zwischen den AbrB-Proteinen bestehen über die C-Termini

direkte Kontakte. Diese könnten über die positive Kooperativität den Komplex stabilisieren. Ein AbrB-Tetramer könnte ungefähr 18 bp der DNA abdecken. Dieser Größenbereich wurde aus den NMR- und SAXS-Strukturgrößen der AbrB-Proteine (Kapitel 2.4.2) unter Subtraktion der Hydrathülle abgeschätzt. Ausgehend von der Tatsache, dass in den DNaseI-Footprints insgesamt 125 bp (ABS2) bzw. 175 bp (ABS1) vor dem Verdau geschützt waren (Makarewicz *et al.* 2008), müsste dies den ca. 7 bis 10 AbrB-Tetrameren entsprechen, die gleichzeitig an die *phyC*-Region binden könnten. Die Wechselwirkungen der AbrB-Tetramere mit der DNA führen wahrscheinlich zu einer Schleifenbildung der nicht-gebundenen Zwischenregion (162 bp lang), wobei jedes Tetramer mit den beiden ABSs gleichzeitig interagiert. Da jedoch die ABS1 größer als die ABS2 ist, müssten randständige AbrB-Tetramere vorhanden sein, die nur an die ABS1 binden, was vermutlich mit einer niedrigen Stabilität der Bindung einhergeht und somit einen Angriffspunkt für den AbrB-Antirepressor AbbA darstellt.

Der Antirepressor AbbA verdrängt den Repressor AbrB von der *phyC*-DNA und besetzt dabei die DNA-Bindungsstellen innerhalb des AbrB-Tetramers. Dieser Mechanismus wurde schon von Banse *et al.* (2008) vorgeschlagen, nach dem AbbA das AbrB möglicherweise zuerst von den niedrigaffinen Bindungsstellen der DNA verdrängt. Aus den SPR-Experimenten geht hervor, dass die K_D -Werte, die aus den vier kinetischen Parametern abgeleitet wurden (Tabelle 2.2), einen deutlichen Unterschied in der Affinität zwischen den zwei Oligonukleotid-Gruppen besaßen. Die kooperativen GI-Oligonukleotide wiesen eine höhere Affinität zu AbrB im Vergleich zu den nicht-kooperativen GII-Oligonukleotiden auf. Somit könnte die Bindung eines AbbA-Dimers an eine der freien DNA-Bindungsdomänen des AbrB-Tetramers (Abbildung 3.5 B), welches mit der niedrigaffinen und nicht-kooperativen DNA-Position interagiert, zu einer Störung der kooperativen Interaktion zwischen den AbrB-Tetrameren führen. Der DNA-AbrB₄-AbbA₂-Komplex würde damit die positive Kooperativität innerhalb des AbrB-Tetramers negativ beeinflussen und zur Auflösung der DNA-Schleife führen (Abbildung 3.5 C). Die frei gewordenen DNA-Bindungsdomänen des AbrB-Tetramers würden nacheinander durch AbbA-Dimere besetzt werden. Die durch die AbbA-Bindung verursachte negative Kooperativität müsste damit zur beschleunigten Dissoziation der gegenüberliegenden *phyC*-DNA führen und dadurch das AbrB-Protein von der DNA ablösen.

Die frei gewordene *phyC*-Promotorregion wird für den RNAP-PhoP~P-Initiationskomplex zugänglich (Abbildung 3.5 D). Der Transkriptionsaktivator PhoP~P rekrutiert die RNAP zum *phyC*-Promotor, fungiert dabei als verlängerte Region 4 des σ^A -Faktors der RNAP und ermöglicht somit der RNAP die Entfernung bis zur -10-Region zu überbrücken (Makarewicz *et al.* 2006, Neubauer 2008).

Bei einer hohen AbbA-Konzentration scheinen beide Bindungsstellen des AbrB-Tetramers durch AbbA besetzt zu sein (Abbildung 3.5 D). Der genaue Mechanismus der Antirepression bleibt allerdings spekulativ und bedarf weiterer kinetischer Untersuchungen.

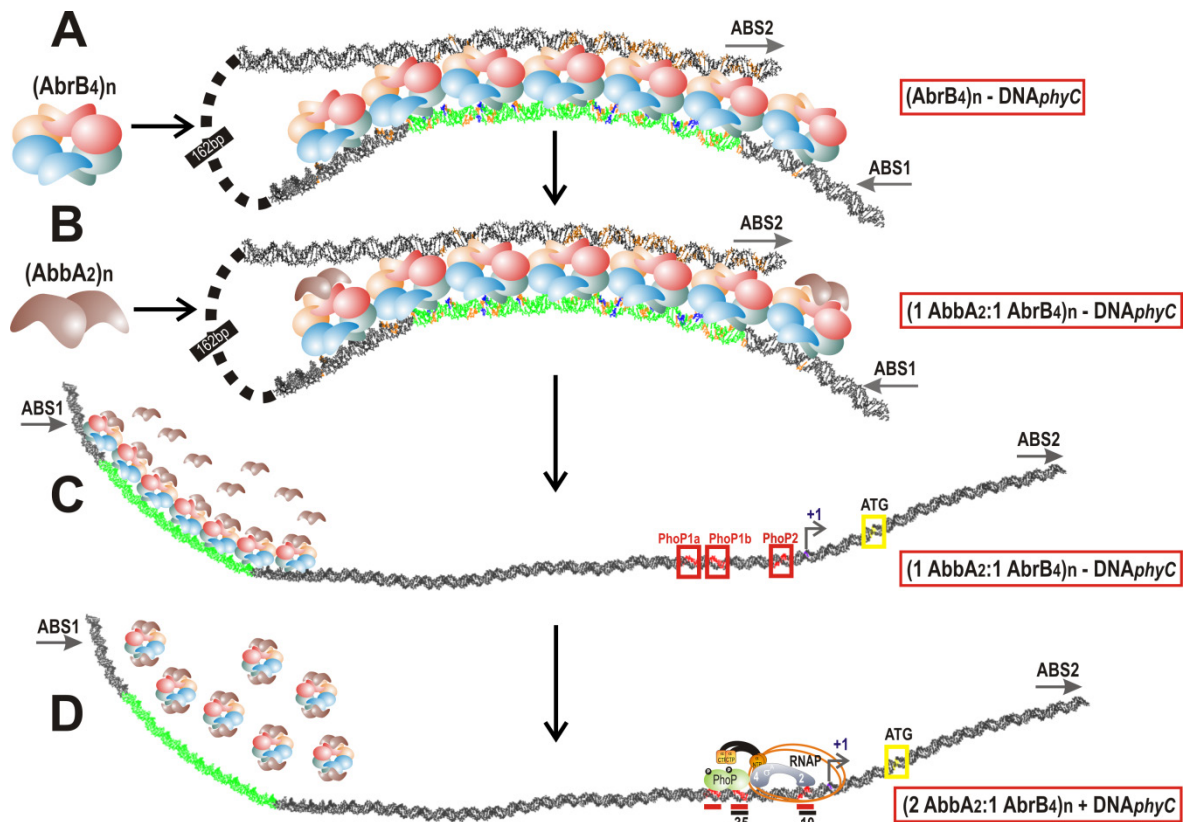


Abbildung 3.5: Das vereinfachte Modell zur transkriptionalen Regulation des *phyC*-Gens aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 durch AbrB, AbbA und PhoP~P.

Die Pfeile der AbrB-Bindungsstellen (ABS1 und ABS2) zeigen die Leserichtung des *phyC*-Gens an. Die hervorgehobene Kernregion innerhalb der ABS1 (grün) wurde aus den chemischen Footprintassays abgeleitet. Die starken Kontaktpositionen (Basen) sind blau und die schwachen orange-farben markiert. Die gelb eingerahmte Stelle innerhalb der ABS2 ist ATG. PhoP-Boxen sind rot eingerahmt. AbrB-Tetramer und AbbA-Dimer wurden vereinfacht dargestellt. Zu jedem Bindungsmechanismus ist die Stöchiometrie (rechts, rot eingerahmt) dargestellt. Die langgestreckte DNA-Doppelhelix der kompletten *phyC*-DNA, welche die beiden ABSs und die Zwischenregion umfasst, wurde mit dem *online*-Programm nach Munteanu *et al.* (1998) berechnet.

4 Material

4.1 Plasmide

Tabelle 4.1: Ausgangsplasmide für Klonierungen

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
pET28a(+)	Km ^R , T7 <i>lac lacI</i> , N-terminaler His ₆ -Tag, Thrombinschnittstelle	Novagen
pET28b(+)	Ap ^R T7 <i>lac lacI</i> , C-terminaler His ₆ -Tag	Novagen
pET15b	Ap ^R T7 <i>lac lacI</i> , N-terminaler His ₆ -Tag, Thrombinschnittstelle	Novagen
pABRB	pET15b mit <i>abrB</i> -Gen (285 bp; 94 AS) aus <i>B. subtilis</i> 168 → NdeI/ BamHI, 114 AS Protein	Makarewicz <i>et al.</i> (2008)
pDG268	amyE:: (cm ^R spoVG-lacZ) Ap ^R	Antoniewski <i>et al.</i> (1990)
pGEMT	Ap ^R <i>lacZ</i>	Promega

Tabelle 4.2: Expressionsplasmide

Bezeichnung	Ausgangsvektor	Beschreibung	Referenz
pABRBQ81K	pABRB	pABRB (285 bp; 94 AS), Substitution <u>CAA:AAA</u> (-241*), AS-Substitution Q81K → 114 AS Protein	Makarewicz <i>et al.</i> (2008)
pABRB55	pABRB	pABRB (168 bp; 55 AS), Substitution <u>GTA:TAA</u> (-166*, -167*) → 75 AS Protein	Neubauer <i>et al.</i> (2012)
pABRBR15A**	pABRB	pABRB (285 bp; 94 AS), Substitution <u>CGT:GCT</u> (-43*, -44*), AS-Substitution R15A → 114 AS Protein	ABiTEP GmbH
pABBABS	pET28a(+)	pET28a mit <i>yzkF</i> -Gen (198 bp; 65 AS) aus <i>B. subtilis</i> → NdeI/ BamHI, 68 AS Protein nach Thrombinverdau	ABiTEP GmbH
pABBABA	pET28a(+)	pET28a mit <i>yzkF</i> -Gen (198 bp; 65 AS) aus <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB45 → NdeI/ BamHI, 68 AS nach Thrombinverdau	ABiTEP GmbH
pPHOP	pET15b	pET15b mit <i>phoP</i> -Gen (725 bp Insert) aus <i>B. subtilis</i> → NdeI/ XhoI	Makarewicz <i>et al.</i> (2006)
pPHOR231	pET28b(+)	pET28b(+)/C-terminale Domäne von <i>phoR</i> -Gen (1051 bp Insert) aus <i>B. subtilis</i> → NcoI/ XhoI	Makarewicz <i>et al.</i> (2006)

* Die Position der Substitution von *abrB* ist relativ zum Translationsstartpunkt. **Die Tabelle mit allen mutagenesierten pABRB-Plasmiden ist im Anhang, Tabelle 7.1.

Tabelle 4.3: Plasmide für Mutagenese der *phyC*-Promotorregion

Bezeichnung	Ausgangsvektor	Bemerkung	Position relativ zum Transkriptionsstart
pSN1	pDG268	<i>phyC</i> aus <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB45, Amplifikat mit Sn4- und Om09-Primern, Klonierung über EcoRI und BamHI	-392 bis +221
pSN34-1	pSN1	Transversion an -287 bis -284 (TTAT→GGAG)	-392 bis +221
pSN34-2	pSN1	Transversion an -262 bis -260 (CCA→GGC)	-392 bis +221

4.2 Stämme

Tabelle 4.4: Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE hsdR17 recA1 ΔlacU169(Ø80lacZΔM15) gyrA96 thi-1 endA1</i>	Laborstamm
XL10 Gold	Tet ^R Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lac^RZΔM15 Tn10 (Tet^R) amy Cam^R</i>]	Stratagene
BL21 (C43)	F' <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
<i>Bacillus subtilis</i>		
168	<i>trpC2</i>	BGSC
MF1	<i>trpC pheA1 Km^R rpoG^{his6}</i>	Fujita <i>et al.</i> (1998)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		
FZB45	wt	ABiTEP GmbH

Tabelle 4.5: *E. coli* Klonierungsstämme

Stamm	Rezipient	Vektor	Referenz
ABRBBS	DH5α	pABRB	Makarewicz <i>et al.</i> (2008)
ABRBQ81K	XL10-Gold	pABRBQ81K	Makarewicz <i>et al.</i> (2008)
ABRB55	XL10-Gold	pABRB55	Neubauer <i>et al.</i> (2012)
XLABRBR15A*	XL10-Gold	pABRBR15A	ABiTEP GmbH
PHOP	DH5α	pPHOP	Makarewicz <i>et al.</i> (2006)

PHOR231	DH5α	pPHOR231	Makarewicz <i>et al.</i> (2006)
DHABBAFZB45	DH5α	pABBABA	ABITEP GmbH
DHABBABS168	DH5α	pABBABS	ABITEP GmbH

* Weitere mutagenesierte XLABRB-Klonierungsstämme wurden nach dem gleichen Prinzip (nach der Position der substituierten AS) benannt.

Tabelle 4.6: *E. coli*-Expressionsstämme

Stamm	Rezipient	Vektor	Protein
BLABBAFZB45	BL21 (C43)	pABBABA	AbbA BA
BLABBABS168	BL21 (C43)	pABBABS	AbbA BS
ECABRBS	BL21 (C43)	pABRB	AbrB BS
ECABRBQ81K	BL21 (C43)	pABRBQ81K	AbrB BA
ECABRB55	BL21 (C43)	pABRB55	AbrBN
BLABRBR15A	BL21 (C43)	pABRBR15A	AbrB R15A
BLABRBQ55A	BL21 (C43)	pABRBQ55A	AbrB Q55A
BLABRBD62A	BL21 (C43)	pABRBD62A	AbrB D62A
BLABRBK71A	BL21 (C43)	pABRBK71A	AbrB K71A
BLABRBK76A	BL21 (C43)	pABRBK76A	AbrB K76A
BLABRBE77A	BL21 (C43)	pABRBE77A	AbrB E77A
BLABRBE80A	BL21 (C43)	pABRBE80A	AbrB E80A
BLABRBQ81A	BL21 (C43)	pABRBQ81A	AbrB Q81A
BLABRBE85A	BL21 (C43)	pABRBE85A	AbrB E85A
BLABRBQ87A	BL21 (C43)	pABRBQ87A	AbrB Q87A
BLABRBN88A	BL21 (C43)	pABRBN88A	AbrB N88A
BLABRBQ89A	BL21 (C43)	pABRBQ89A	AbrB Q89A
BLABRBQ91A	BL21 (C43)	pABRBQ91A	AbrB Q91A
BLABRBK94A	BL21 (C43)	pABRBK94A	AbrB K94A
BLABRBQ55E	BL21 (C43)	pABRBQ55E	AbrB Q55E
BLABRBQ81E	BL21 (C43)	pABRBQ81E	AbrB Q81E
BLABRBN88D	BL21 (C43)	pABRBN88D	AbrB N88D
BLABRBK94I	BL21 (C43)	pABRBK94I	AbrB K94I
ECPHOP	BL21 (C43)	pPHOP	PhoP
ECPHOR231	BL21 (C43)	pPHOR231	PhoR231

4.3 Oligonukleotide und Nukleotide

Tabelle 4.7: Primer für die Klonierung der AbbA-Proteine

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Schnittstelle
AbbAFZB45for	TAGGGGGCCCATATGCGTATGAGTCTTATCAG	NdeI
AbbAFZB45rev	ATAGGCGGATCCTTAATTTTCATTCCG	BamHI
AbbABSfor	CAGGGGGCCCATATGCGAATGAGTCTTATCG	NdeI
AbbABSrev	TAGGGTGGATCCTTAATTTTCAAATCGAAATCG	BamHI

Tabelle 4.8: Primer für Klonierung der AbrB-Varianten

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Substitution
AbrB55for	CCAAACATGACTTGCCAATAAACTGGTGAAG	GT:TA
AbrB55rev	CTTCACCAGTTTATTGGCAAGTCATGTTTGG	
R15Afor	TGATGAATTAGGAGCTGTAGTTATTCCTATCGAAC	CGT:GCT
R15Arev	GATAGGAATAACTACAGCTCCTAATTCATCAACTTTACG	
Q55Afor	AAACATGACTTGCGCAGTAACTGGTGAAGTTTCTG	CAA:GCA
Q55Arev	CAGAAACTTCACCAGTTACTGCGCAAGTCATGTTTGG	
D62Afor	AGTTTCTGCTGATAACCTTAACTTGC	GAT:GCT
D62Arev	AAGGTTATCAGCAGAACTTCACCAG	
K71Afor	CGGTGCATTGGTTCTTAGTAAAGAAGG	AAA:GCA
K71Arev	CCAATGCACCGCCTGCAAGTTTAAGG	
K76Afor	TTCTTAGTGCAAGGCGCTGAGC	AAA:GCA
K76Arev	CCTTCTGCACTAAGAACCAATTTACC	
E77Afor	AAGCAGGCGCTGAGCAAATCATCAGC	GAA:GCA
E77Arev	TGCTCAGCGCCTGCTTTACTAAGAACC	
E80Afor	GCTGCGCAAATCATCAGCGAAATCC	AAC:GCC
E80Arev	TTGCGCAGCGCCTTCTTTACTAAGAACC	
Q81Afor	TAAAGAAGGCGCTGAGGCAATCATCAGCGAAATCC	CAA:GCA
Q81Arev	TCGCTGATGATTGCCTCAGCGCCTTCTTTACTAAG	
E85Afor	AATCATCAGCGCAATCCAAAACCAGC	GAA:GCA
E85Arev	TGGATTGCGCTGATGATTTGCTCAGC	
Q87Afor	CGAAATCGCAAACCAGCTTCAAAACC	CAA:GCA
Q87Arev	CTGGTTTGCGATTTGCTGATGATTTGC	
N88Afor	ATCAGCGAAATCCAAGCCCAGCTTCAAAACCTT	AAC:GCC
N88Arev	AAGGTTTTGAAGCTGGGCTTGGATTTGCTGATG	
Q89Afor	GCGAAATCCAAAACGCGCTTCAAAACCTTAAATAATC	CAG:GCG
Q89Arev	TTTTGAAGCGCGTTTTGGATTTGCTGATGATTTGC	
Q91Afor	CAGCTTGCAAACCTTAAATAATCATTTCTTGTAC	CAA:GCA
Q91Arev	AAGGTTTGCAAGCTGGTTTTGGATTTG	
K94Afor	CAAAACCTTGCAATAATCATTTCTGTACAAAAAACG	AAA:GCA
K94Arev	AGAAATGATTATGCAAGGTTTTGAAGCTGGTTTTGG	
K94Ifor	CAAAACCTTATATAATCATTTCTGTACAAAAAACG	AAA:ATA
K94Irev	TACAAGAAATGATTATATAAGGTTTTGAAGCTGGTTTTGG	

Q81Efor	TAAAGAAGGCGCTGAGGAAATCATCAGCGAAATCC	CAA:GAA
Q81Erev	TCGCTGATGATTTCCTCAGCGCCTTCTTTACTAAG	
Q55Efor	AAACATGACTTGCGAAGTAACTGGTGAAGTTTCTG	CAA:GAA
Q55Erev	CAGAACTTCACCAGTTACTTCGCAAGTCATGTTTGG	
N88Dfor	ATCAGCGAAATCCAAGACCAGCTTCAAAACCTT	AAC:GAC
N88Drev	AAGGTTTTGAAGCTGGTCTTGGATTTCGCTGATG	

Tabelle 4.9: *phyC*-Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Position zum Transkriptionsstart
D1for	GTATTTTACAATTAAAGTGAACGTTCAATTAAGGAGGAA	-18 bis +21
D2for	ACGTTCAATTAAGGAGGAAGGAAAATGAATCATTCAAAA	+2 bis +41
D3for	GGAAAATGAATCATTCAAAAACACTTTTGTTAACCGCGGC	+22 bis +61
D4for	ACACTTTTGTTAACCGCGGCAGCCGGATTGATGCTCACAT	+32 bis +71
D5for	AGCCGGATTGATGCTCACATGCGGTGCGGTTTCTTCCCAGGGCAAG	+62 bis +107
F2for	AATATTTGCTCACGTCAATTTTTTTCTCC	-104 bis -75
F2rev	GTGTTTTGAATGATTCATTTCTTCC	+13 bis +41
F3for	CCTGTATGTATTTACAATTAAAGTGAACG	-25 bis +5
F3rev	GTGATAAGGATCAGACAGCTTATGC	+107 bis +131
Om09BamHI	ATTCTTGGGATCCAGCCAAATCG	+199 bis +221
Om09	ATTCTTGGGAGCCAGCCAAATCG	+199 bis +221
Sn5	TCGTGAAAAAACGTTGTAGC	-333 bis -314
Sn6	TTGCCCTGGGAAGAAACC	+90 bis +107
SinIRAbrB-for*	GTGATTTAATGGCAATGACTTCCAGAGACTAATGA	+20 bis +55
SinIRAbrB-rev	TCATTAGTCTCTGGAAGTCATTTGCCATTAAATCAC	+20 bis +55
Sn3	TATTCTATTAATCGGATAAAGCG	-208 to -185
Sn4EcoRI	GCGTTTTACTATTTGAATTCGA	-392 bis -373
Sn4	GCGTTTTACTATTTGGCTTCC	-392 bis -371
Sn43-1for	TGGCGGAGCCTCCAACCTCTGTTTCTCTACC	-291 to -261
Sn34-1rev	TGGAGGCTCCGCCATGCCTAACAGCAAGC	-307 to -277
Sn34-2for	TTTCTCTAGGCTGCATCATATGTTGAACAATTTCA	-270 to -235
Sn34-2rev	ATGATGCAGCCTAGAGAAACGAGAGTTGGAGG	-283 to -252
U1for	CCTGTGACGAGAACAGTTTTATCGTGAAAAAACGTTGTA	-355 bis -315
U1rev**	TACAACCGTTTTTTCACGATAAACTGTTCTCGTCACAGG	-355 bis -315
U2for	ATCGTGAAAAAACGTTGTAGCTCTACTGCTTGCTGTTTA	-335 bis -295
U3for	GCTCTACTGCTTGCTGTTTAGGCATGGCTTATCCTCCAAC	-315 bis -275
U4for	GGCATGGCTTATCCTCCAACCTCGTTTCTCTACCATGCA	-295 bis -255
U5for	TCTCGTTTCTCTACCATGCATCATATGTTGAACAATTTCA	-275 bis -235
U6for	TCATATGTTGAACAATTTTACGCGAGTTAATGAAAGAAACC	-255 bis -215

U7for	GCGAGTTAATGAAAGAAACCAATAAATCAAAAATTAGAGA	-235 bis -195
U8for	AATAAATCAAAAATTAGAGAAAAACATTAATCTGA	-215 bis -181
YodU3rev	TCACATATTGGATCCTGTCATCTTTGC	-455 bis -429

* Die Position der SinIRAbrB- Primer wurde relativ zum Transkriptionsstartpunkt von P1-Promotor dargestellt. Die ss-Oligonukleotide U1 bis U8 und D1 bis D5 wurden bei Eurofins MWG Operon bestellt und sind komplementär zueinander (** U1rev ist komplementär zu U1for).

Tabelle 4.10: Verwendete Promotorfragmente

Fragment	Bezeichnung	Größe [bp]	Position zum Transkriptionsstart
YodU3rev-Om09	FFL1	676	-455 bis +221
Sn4-Om09	FFL2	613	-392 bis +221
Sn5-Sn6	FFL3	440	-333 bis +107
Sn4-F3rev	FFL4	523	-392 bis +131
F2for-Om09	FD1 bzw. ABS2	325	-104 bis +221
F3for-F3rev	FD2 bzw. ABS2	156	-25 bis +131
Sn4-Sn3	SN34-wt bzw. ABS1	207	-392 bis -185
SN34-1	SN34-1	207	-392 bis -185
SN34-2	SN34-1	207	-392 bis -185
SinIRAbrBfor-rev	<i>sinIR</i> -AbrB Bindungsstelle	36	+20 bis +55

FFL = DNA-Fragment *full-length*; FD = DNA-Fragment *downstream*. ABS2-Fragment als F2for/Om09-PCR-Produkt wurde für *in vitro* Transkription als DNA-*template* genommen und ABS2-Fragment als F3for/F3rev-PCR-Produkt für chemische Interferenz-Footprints.

Tabelle 4.11: Nukleotide

Bezeichnung	Endkonzentrationen	Hersteller
ATP	15 mM	Roth
dNTP (A/T/C/G)	0,1 mM	Fermentas
NTP-Gemisch	4 mM ATP, CTP und GTP + 0,6 mM UTP	Fermentas
[γ -P32]-ATP	5-40 pmol bzw. 40 μ Ci	Hartmann
[α -P32]-UTP	2 μ Ci	Hartmann

4.4 Weitere Enzyme und Proteine

Tabelle 4.12: Restriktionsenzyme

Bezeichnung	Konzentrationen	Restriktionsschnitt	Hersteller
BamHI	10 U/ μ l	G↓GATCC	Fermentas
DpnI	10 U/ μ l	Gm ₆ ATC	Fermentas
EcoRI	10 U/ μ l	G↓AATTC	Fermentas
NcoI	10 U/ μ l	G↓CATGG	Fermentas
NdeI	10 U/ μ l	CA↓TATG	Fermentas

Tabelle 4.13: Weitere Enzyme

Bezeichnung	Konzentrationen	Hersteller

Benzonase Nuklease	25 U/μl	Novagen
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	2,5 U/μl	Fermentas
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	2,5 U/μl	Peqlab Biotechnologie GmbH
Lysozym aus Hühnereiweiß	20000 U/ mg	Roth
Proteinase K	100 μg/ml und 10 mg/ml	Roth und Peqlab
RNase A	10 mg/ml	Fermentas und Peqlab
RNase-Inhibitor	40 U/μl	Fermentas
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	5 U/μl	Bioron
Thermosensitive Alkaline Phosphatase	1 U/μl	Fermentas
T4 DNA Ligase	5 U/μl	Fermentas
T4 Polynukleotidkinase (PNK)	10 U/μl	Fermentas

Tabelle 4.14: Verwendete Antikörper

Antigen	IgG	Konjugat	Hersteller
His ₆ -Tag von Proteinen	Kaninchen	kein	Santa Cruz
Kaninchen IgG	Ziege	Alkalische Phosphatase (AP)	Sigma-Aldrich

Tabelle 4.15: Verwendete Enzymsubstrate und Kopplungsreagenzien

Bezeichnung	Reaktionslösung	Hersteller
BCIP	50 mg/ml in 70 %-igem Formaldehyd	Roth
EDC	0,4 M in H ₂ O	GE Healthcare
Ethanolamin	1 M in H ₂ O, pH 8,5	GE Healthcare
NBI	50 mg/ml in 70 %-igem Formaldehyd	Roth
NHS	0,1 M in H ₂ O	GE Healthcare
SDA	10 mM in DMSO	Thermo Scientific

4.5 Antibiotika

Tabelle 4.16: Verwendete Antibiotika

Bezeichnung	Stocklösung	Endkonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml	100 μg/ml	Roth
Kanamycin	50 mg/ml	5 μg/ml für <i>B. subtilis</i> 50 μg/ml für <i>E. coli</i>	Roth

Stocklösungen wurden in *A. bidest* angesetzt, steril filtriert und in kleinen Mengen bei -20°C gelagert.

4.6 Größenstandards

Tabelle 4.17: Verwendete Molekularmarker

Bezeichnung	Referenzbereich	Hersteller
Lambda-(I)-DNA/EcoRI/HindIII Marker	125-21226 bp	Fermentas
MassRuler™ DNA Ladder Mix	80-10000 bp	Fermentas
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	11-170 kDa	Fermentas

4.7 Puffer, Lösungen, Fertigreagenzien

Tabelle 4.18: Verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
DNA/ RNA/ Protein-Assays:	
1 x TE-Puffer	10 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM EDTA
5 x Bindungspuffer	100 mM TrisHCl (pH 7,5), 500 mM KCl, 5 mM DTT, 50 % Glycerin
5 x Transkriptionspuffer	100 mM TrisHCl (pH 8,0), 50 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 250 mM KCl, 5 mM CaCl ₂ , 100 µM EDTA, 5 mM DTT, 10 % Glycerin
SPR-Puffer 1 (für AbrB/ DNA-Verdünnung)	10 mM NaAcetat (pH 5,5), 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20
Laufpuffer 1 (SPR, AbrB- DNA-Assays)	10 mM NaAcetat (pH 5,5), 150 mM NaCl
SPR-Puffer 2 (für Abba/ AbrB- Verdünnung)	50 mM HEPES (pH 7,4), 300 mM NaCl, 1 bzw. 10 mM DTT, 10 % Glycerin
Laufpuffer 2 (SPR, Abba- AbrB- Assays)	50 mM HEPES (pH 7,4), 300 mM NaCl, 10 mM DTT
HEPES _{Fluoreszenz} -Puffer	50 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM β-Mercaptoethanol
CD-Puffer für AbrB	10 mM TrisHCl (pH 7,4), 300 mM NaF, 10 mM DTT, 10 % Glycerin
CD-Puffer für Abba	10 mM TrisHCl (pH 7,4), 300 mM NaF, 1 mM DTT, 10 % Glycerin
SAXS-Puffer für AbrB	50 mM TrisHCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM β-Mercaptoethanol
SAXS-Puffer für Abba	50 mM TrisHCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM DTT
Elektrophorese:	
TAE-Puffer	40 mM Tris (pH 8,5), 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid
10 x TG-Laufpuffer	250 mM TrisHCl (pH 8,8), 1,92 M Glycin
1 x SDS-Laufpuffer	1 x TG-Laufpuffer, 1 % (w/v) SDS
10 x TBE	1 M Tris, 830 mM Borsäure, 10 mM EDTA (pH 8,3)
SDS-Acrylamidgele	Trenngel: 10 %, 12 %, 14 % AA/BAA (29:1) in 0,375 mM TrisHCl (pH 8,8), 0,1 % SDS, 0,075 % APS, 0,05 % TEMED
Trenngelpuffer	1,5 M TrisHCl (pH 8,8)
Sammelgelpuffer	0,5 M TrisHCl (pH 6,8)
Blotting-Buffer	1 x TG-Laufpuffer, 20 % Methanol
DNA-Agarosegel	0,8 %, 1,2 % und 1,5 % Agarose in 1 x TAE-Puffer
Natives Acrylamidgel	6 % AA/BAA (29:1), 1 x TBE, 0,08 % APS, 0,01 % TEMED

Protein-Agarosegel	2 % Agarose in 1 x TG-Laufpuffer (pH 8,8 oder 8,0)
Harnstoff-Acrylamidgel	6 % AA/BAA (19:1), 1 x TBE, 8 M Harnstoff, 0,08 % APS, 0,01 % TEMED
Entwicklungslösungen:	
10 x TBST	100 mM Tris (pH 8,0), 1,5 M NaCl, 0,5 % Tween 20
AP-Puffer	50 mM TrisHCl (pH 9,5), 25 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl
Proteinfärbelösung	0,2 % Coomassie R250, 0,05 % Coomassie G250, 42,5 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 5 % Methanol, <i>A. bidest</i>
Page Blue Protein Staining Solution	Fertiglösung, Fermentas
Entfärber	1 (v/v) konz. Essigsäure, 1 (v/v) Ethanol (96 %), 5 (v/v) <i>A. bidest</i>
Fixierer	10 % Essigsäure, 20 % Ethanol
Ladepuffer:	
6 x DNA-Ladepuffer	30 % Glycerin, 10 mM EDTA (pH 8,0), 0,25 % Bromphenolblau
6 x MassRuler™ DNA Loading Dye	10 mM TrisHCl (pH 7,6), 0,03 % Bromphenolblau, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA (Fermentas)
5 x SDS-Ladepuffer	0,125 M TrisHCl (pH 6,8), 20 % Glycerin, 4 % SDS, 1,4 M β-Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau
Stopp-Lösung	95 % deionisiertes Formamid, 20 mM EDTA (pH 8,0), 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol
Proteinreinigungspuffer:	
Sonifikationspuffer für PhoP-Isolierung	50 mM TrisHCl (pH 7,5), 5 mM MgSO ₄ , 1 M NaCl
I-Puffer für RNAP	10 mM TrisHCl (pH 8,0), 0,1 M KCl, 1 mM β-Mercaptoethanol, 10 % Glycerin
G-Puffer für RNAP	10 mM TrisHCl (pH 8,0), 20 % Glycerin
B-(PhoR)-Puffer	10 mM TrisHCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 20 % Glycerin
AbrB-Reinigungspuffer	50 mM TrisHCl bzw. HEPES (pH 7,4), 300 mM NaCl, 2 mM β-Mercaptoethanol, 10 % Glycerin
AbbA-Reinigungspuffer	50 mM TrisHCl (pH 7,4), 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 % Glycerin
Nickel-Agarose-Säule:	
Ni-Waschlösung	0,2 % Essigsäure, 10 % Glycerin
Ni- <i>Restore</i> -Lösung	30 % Ethanol, 10 % Glycerin, Lagerung bei +4° C
Imidazol-Stocklösung	2 M in TrisHCl-Puffer bzw. HEPES-Puffer (pH 7,4) bzw. G-Puffer
Protein-Dialysepuffer:	
Dialysepuffer für AbrB	50 mM TrisHCl bzw. HEPES (pH 7,4), 300 mM NaCl, 2 mM β-Mercaptoethanol, 50 % Glycerin
Dialysepuffer für AbbA	50 mM TrisHCl (pH 7,4), 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 50 % Glycerin
Dialysepuffer für σ ^A RNA-Polymerase	10 mM TrisHCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 0,3 mM DTT, 50 % Glycerin
Dialysepuffer für PhoP	1. Schritt: 20 mM TrisHCl (pH 7,5), 30% Glycerin, 300 mM NaCl; 2. Schritt: 20 mM TrisHCl (pH 7,5), 50% Glycerin, 100 mM NaCl

Dialysepuffer für PhoR	10 mM TrisHCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol, 50 % Glycerin
Dialysepuffer für CD	10 mM TrisHCl (pH 7,4), 300 mM NaF, 1 mM bzw. 10 mM DTT, 10 % Glycerin
Dialysepuffer für BIACORE	50 mM HEPES (pH 7,4), 300 mM NaCl, 1 mM bzw. 10 mM DTT, 10 % Glycerin
Dialysepuffer für Fluoreszenz-Messungen	50 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM β -Mercaptoethanol
AbbA-Dialysepuffer für SAXS	50 mM TrisHCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM DTT
AbrB-Dialysepuffer für SAXS	50 mM TrisHCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM β -Mercaptoethanol
Thrombin-Agarose-Säule:	
Regenerierungspuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl
Thrombin-Waschpuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Thrombin-Restore-Lösung	20 mM TrisHCl (pH 8,0), 50 % Glycerin, Lagerung bei -20°C
Chemische Interferenz-Footprints:	
DMS-Puffer	50 mM NaCacodylat (pH 7,0), 1 mM EDTA
G-Stopplösung	1,5 M NaAcetat (pH 7,0), 1 M β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 0,25 g/l tRNA
Eluierungspuffer	50 mM TrisHCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 0,15 M NaCl
T-Puffer	20 mM NH_4 Acetat (pH 7,0), 0,1 mM EDTA
KMnO_4 -Interferenz-Stopplösung	1,5 M NaAcetat (pH 7,0), 1 M β -Mercaptoethanol
NH_2OH -Interferenz-Stopplösung	0,3 M NaAcetat (pH 7,0), 0,1 mM EDTA

Tabelle 4.19: Weitere Lösungen

Arbeitslösungen	Konzentration	Hersteller
Agarose	0,8 %, 1,2 %, 2 %	Roth
Agar-Agar	1,5 %	Serva
APS	10 %	Merck
Bromphenolblau	1 %	Roth
CaCl-Lösung	100 mM	Roth
DTT	1 M	Roth, Merck
Ethanol (reinst)	70 %	Merck
Formamid, deionisiert	95 %	Roth
Glykogen	10 g/ml	Serva
Harnstoff	7 M	MP, Biomedicals, Inc.
Heringsperma-DNA	0,7 und 10 g/l	Roth
KCl-Lösung	2 M, 3 M	Roth
KMnO_4	125 mM	VEB Laborchemie Apolda
Laktose	20 %	Merck

MgCl ₂ -Lösung	2 M	Roth
NaAcetat	3 M, pH 5	Roth
NaCacodylat	1 M, pH 7 und pH 8	Sigma Aldrich
NaOH	2 M	Roth
NH ₂ OH	4 M, pH 6	Sigma Adrich
Piperidin	1 M	Merck
PMSF	100 mM in Isopropanol bzw. DMSO	Serva
Xylencyanol	2 %	Roth

Tabelle 4.20: Verwendete Fertigreagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
29:1 Acrylamid/ Bisacrylamid 40%	Roth
19:1 Acrylamid/ Bisacrylamid 40%	Roth
Bradfordreagenz	Roth
Calf Thymus DNA 10 mg/ml	Fermentas
Dimethylsulfat 99,8 %	Sigma Adrich
Diethylamin 99,5 %	Sigma Adrich
Ethanol (reinst) 96 %	Merck
Ethydiumbromid 10 mg/ml	Roth
Formamid, deionisiert ≥99,5 %	Roth
Isopropanol ≥99,9 %	Roth
konzentrierte HCl 32 %	Roth
β-Mercaptoethanol ≥99 %	Merck
Ni ²⁺ -NTA Agarose	Qiagen
Page Blue Protein Staining Solution	Fermentas
TEMED ≥99 %	Roth
Tween 20	Biorad

4.8 Medien

Je nach Vorschrift wurden zusätzlich Antibiotika (Tabelle 4.16), Zucker, Salze (Tabelle 4.19) und andere Bestandteile in den oben aufgeführten Endkonzentrationen zugegeben.

Tabelle 4.21: Vollmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB	10 g/l Casein (tryptisch verdaut), 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,5
LB-Platten	wie LB-Medium mit 15 g/l Agar (1,5 %-iges Agar-Agar)
2 X TBY	20 g/l Casein (tryptisch verdaut), 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5

NZY ⁺	10 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 12,5 mM MgCl ₂ , 12,5 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose, pH 7,5
------------------	---

4.9 Kommerzielle Kit-Systeme

Tabelle 4.22: Verwendete Kit-Systeme

Bezeichnung	Hersteller
BCA TM Protein Assay Kit	PIERCE
NucleoSpin Extrakt II Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
peqGold Bacterial DNA Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH
Protino Ni-TED 1000 Packed Columns	Macherey-Nagel
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel
QIAquick Nukleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QuickChange TM II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Agilent Technologies)
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas
Thrombin Clean Cleave TM Kit	Sigma-Aldrich

4.10 Geräte und Materialien

Tabelle 4.23: Verwendete Geräte

Geräteart	Gerätebezeichnung	Hersteller
Biacore 2000/ 3000		Biacore, GE Healthcare
DNA-Elektrophoresekammer	40-0708	Peqlab Biotechnologie GmbH
DNA-Elektrophoresekammer mit UV-Band-Eluator		Biometra
DNA/RNA-Geltrockner (Isotopenlabor)	SE1160 DryGel	Hoefer Scientific
Dampfsterilisator	Varioklav	H+P
Szintillationszähler		Packard
Elektroporationsanlage	Gene Pulser	Biorad Laboratories Inc.
Elektrophoresekammer 21x50 cm und 38x50 cm (Gießchamber, Puffertank, Plattenset, Spacer, Kämme) (Isotopenlabor)	SequiGen TM	Biorad Laboratories Inc.
FPLC	ÄKTA Unicorn 5.11	GE Healthcare
Geigerzähler	LB123UMO	EG&G BERTHOLD
Geldokumentationsanlage	Gene geniun	Syngene
Heizblock	HBT2-131	HLC-Haep Labor Consult
Heizblock	QBT2	Grant
Inkubationsschüttler	Innova43	New Brunswick Scientific
Kühl-Tischzentrifuge	Mikro 200R	Hettich
Magnetrührer mit Heizplatte	MR3001	Heidolph
Mehrkanalpipette (bis 100 µl)	Research	Eppendorf

MATERIAL

Mikrotiterplattenreader	Multiskan Ascent	Labsystems
NanoDrop	ND2000	Peqlab Biotechnologie
PCR-Maschine	Gene Amp 2700	Applied Biosystems
PCR-Maschine (Isotopenlabor)	TRIO	Biometra
pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Phosphoscreen-Platte		Kodak
Phosphoimager	FX-ProPlus	Biorad Laboratories Inc.
Pipetten (2,5, 10, 100, 1000 µl)	Research	Eppendorf
Präzisionswaage	PT3100 und MC1	Sartorius AG
Proteinelektrophoresekammer	Minicell-Protean-3	Biorad Laboratories Inc.
SAXS-Beamline		
Screen-Eraser	K	Biorad Laboratories Inc.
Semi-Dry-Blotter	Transblot-SD	Biorad Laboratories Inc.
Sicherheitswerkbank	KR-130	KOJAIR Tech OY
Sorvallzentrifuge: Rotor GS3 und SS34	Sorvall RC5B	Thermo Scientific
Spektrofourometer	FluoroMax-4	Horiba Jobin Yvon Inc.
Spektrophotometer	Ultrospec 3100pro	Amersham Biosciences
Spektrophotometer (DNA/RNA-Calculator)	Gene QuantII	Pharmacia Biotech
Spektropolarimeter	J-720 Circular Dichroism	Jasco
Swing-out-Zentrifuge	Sigma 3K10	Sigma-Laborzentrifugen GmbH
Tiefkühltruhe -80°C		GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf
Thermomixer (Isotopenlabor)	5436	Eppendorf
Trockenschrank +180°C		Heraeus
Ultraschallgerät	Sonoplus HD70	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Ultraschallsonde mit Schallkopf MS73 oder Titanteller TT13	UW70	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vakuumpumpe	260 BR	Biorad Laboratories Inc.
Vakuumbzentrifuge	SpeedVac DNA110	Eppendorf
Vortexer	VF2	IKA-Labortechnik
Wasserbad	F10	julabo
Wipptisch	WT17	Biometra biomedizinische Analytik GmbH

Tabelle 4.24: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Amicon Ultra 15 Zentrifugenfilter (30 und 50 kDa)	Millipore
Black Q- Quarzglasküvette 10 mm	Biochrom
CM5 Sensor Chip	Biacore GE Healthcare
C/Q20-Quarzglasküvette 0,1 mm	Sterna
Dialyseschlauch Typ27 (12-16 kDa Membran-Ausschlussgröße)	Biomol
Elektroporationsküvette (Spaltweite 2,5 mm)	Bridge
Eppendorf Reaktionsgefäße (1.5 ml; 2 ml)	Greiner bio-one
Falcon Tubes (15 ml und 50 ml)	Roth
F115-QS-Präzisionsküvette aus Quarzglas SUPRASIL 10 mm	Hellma
Halter für 0,1 mm-Quarzküvette 0,1 mm	Sterna
Kunststoffpipettenspitzen (bis 10, 100, 1000 µl)	Starlab, Roth, Greiner bio-one
Kunststoffpipettenspitzen mit Filter	Neolab
Küvetten	Sarstedt und Biochrom Ltd
Membranfilter (0,2 und 0,45 µm Porengröße)	Schleicher & Schüll
Mikro-Dialysierkapsel (QuixSep)	Roth
Mikrotiterplatten	Greiner bio-one
Nitrozellulose-Membran	Macherey-Nagel
PCR-Stripes 1er und 8er	Biozym Scientific GmbH
Petrischalen	Greiner
Plastic Vials 7 mm, Caps	GE Healthcare Bio-Sciences AB
Polypropylen Round-Bottom Tube (14 ml)	Becton Dickinson Biosciences
QS110-Präzisionsküvette aus Quarzglas SUPRASIL 1 mm	Hellma
Sonstige Glaskolben	Roth, Schott, Technische Glaswerke Ilmenau GmbH
Spitzenfilter (0,22 und 0,45 µm Porengröße)	Macherey-Nagel, Sarstedt
Superdex™ 75/ 200 COLUMNS	GE Healthcare
VivaSpins Zentrifugenfilter (15 und 30 kDa)	Sartorius
Whatman Papier	Macherey-Nagel

4.11 Software, Programme

Tabelle 4.25: Verwendete Softwares und Programme

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Photo Shop CS2	Adobe
ATSAS (PRIMUS, GNOM, GASBOR22, DAMAVER, DAMFILT)	EMBL Hamburg
BIACORE 2000/ 3000 Control Software	Biacore GE Healthcare

BIAevaluation Software 3.1	Biacore GE Healthcare
CorelDRAW 10/ X4	Corel Corporation
Corel Photo-Paint 10/ X4	Corel Corporation
DichroWeb	Dr. L. Whitmore in Department of Crystallography of Prof. B. A. Wallace
DS Gene 1.5	Accelrys
GeneSnap	Synoptics
Microsoft Office Excel, PowerPoint, Word 2007	Microsoft
PyMol Molecular Graphics System 0.99a	DeLano Scientific
QuantityOne 4.5.1	Biorad
RasMol Molecular Graphics Visualisation Tool 2.7.5.2	Roger Sayle

5 Methoden

5.1 Mikrobiologische Methoden

5.1.1 Stammhaltung von Bakterienkulturen

Für eine langfristige Lagerung der Bakterien wurden Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden 5-10 ml LB-Vollmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C im Schüttler ÜN inkubiert. Die Kultur wurde anschließend mit sterilem Glycerin vermischt und als 10 %-ige Glycerinkonserven bei -80°C gelagert.

5.1.2 Kultivierung

5.1.2.1 Zellkulturen für Proteinreinigung

Die Proteinexpression erfolgte in dem *E. coli*-Expressionsstamm BL21. Für die Reinigung von AbrB und AbrB-Derivaten wurden 4 x 500 ml Kulturen in LB-Ap₁₀₀ mit 1 %-iger Laktose angeimpft und ÜN bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Die ÜN-Kulturen wurden am nächsten Tag bei 3500 rpm und 4°C im Sorvall GS3 Rotor pelletiert und die Pellets anschließend gewaschen. Für die Reinigung von AbbA wurden die 4 x 500 ml Kulturen in LB-Km₅₀ mit 1 %-iger Laktose angeimpft.

Bei den Expressionsstämmen ECPHOP bzw. ECPHOR231 wurden 50 ml LB-Ap₁₀₀- bzw. LB-Km₅₀-Vorkultur ÜN bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Daraus wurden dann 2 x 500 ml Kulturen in 2 x TBY- Ap₁₀₀- bzw. - Km₅₀- zu einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Beim Erreichen der OD₆₀₀ von 0,5 wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt und die Kulturen für weitere 3 – 4 h inkubiert, danach erfolgte die Pelletierung bei 5000 rpm und 4°C im Sorvall GS3 Rotor.

Für die Reinigung von RNAP wurde der *Bacillus subtilis* Stamm MF1 in 20 ml LB- Km₅ angeimpft und ÜN bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die LB-Km₅-Hauptkultur (4 x 200 ml) wurde zu einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei 37°C und 200 rpm weiter inkubiert. Die Zellen wurden bei 5000 rpm im Sorvall GS3-Rotor geerntet und anschließend in I-Puffer (Tabelle 4.18, Protein-Reinigungspuffer) gewaschen.

5.1.2.2 Herstellung Ca²⁺-kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung der Ca²⁺-kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Vorschrift von Sambrook (1989). Der *E. coli*-Klonierungsstamm DH5α wurde in 5 ml LB ÜN bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Aus dieser ÜN-Kultur wurde durch eine 1:100 Verdünnung eine frische Kultur in 100 ml LB angeimpft und bis zur OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 4°C und 4000 rpm 10 min im GS3-Rotor abzentrifugiert (Sorvall RC5B). Die Zellen und alle verwendeten Lösungen wurden während der ganzen Durchführung auf Eis gekühlt. Das Zellpellet wurde in 30 ml MgCl₂ (0,1 M) gewaschen und im SS34-Rotor zentrifugiert, danach in 5 ml CaCl₂ (0,1 M) resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und bei 4°C und 3500 rpm 10 min, wie oben

beschrieben, zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4,3 ml CaCl_2 (0,1 M) resuspendiert und mit 0,7 ml Glycerinlösung (87 %) versetzt. Die Zellsuspension wurde schließlich in den vorgekühlten sterilen Tubes zu 200 μl aliquotiert und im Ethanolbad bei -80°C schockgefroren.

5.1.2.3 Transformation der Ca^{2+} -kompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden die Ca^{2+} -kompetenten *E. coli*-Zellen DH5 α auf Eis aufgetaut. Zu den 100 μl Zellen wurden 10 μl des Ligationsansatzes steril pipettiert und diese vorsichtig gemischt. Die Ansätze wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 90 s einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Danach wurden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 800 μl LB wurde der Transformationsansatz für 1,5 h bei 37°C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 200-400 μl des Ansatzes auf den selektiven LB-Platten ausplattiert und ÜN bei 37°C bebrütet.

5.1.2.4 Herstellung elektroporationskompetenter *E. coli*-Zellen

Der *E. coli*-Expressionsstamm BL21 (C43) wurde zuerst für die Transformation elektrokompent gemacht. Dafür wurde eine Vorkultur in 5 ml LB angeimpft und ÜN bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Aus einer ÜN-Kultur wurden 100 ml LB zu einer OD_{600} von 0,1 angeimpft und bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bis die Kultur eine OD_{600} von 0,8 erreicht hat. Die Zellen wurden bei 4°C und 5000 rpm in Sorvall GS3 Rotor pelletiert und zweimal mit 100 ml eiskaltem, sterilem *A. bidest* gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem *A. bidest* aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in den vorgekühlten, sterilen Tubes zu 50 μl portioniert und bei -80°C schockgefroren.

5.1.2.5 Transformation elektroporationskompetenter *E. coli*-Zellen

Die Transformation der elektrokompenten *E. coli*-Zellen erfolgte über die Elektroporation. Die gefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Bridge, Spaltweite 2,5 mm) überführt. Nach der Zugabe von ca. 100 ng Plasmid-DNA wurden die Ansätze 10 min auf Eis inkubiert, dann einem Elektroschock mit 1,7 kV 25 μF und 200 Ω für 1 s ausgesetzt und sofort auf Eis gestellt. Zu dem Transformationsansatz wurden 800 μl des vorgewärmten SOC-Medium zugegeben und die Zellen für 1,5 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. 200-400 μl des Ansatzes wurden auf den selektiven LB-Platten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

5.1.2.6 Transformation XL10-Gold ultrakompententer *E. coli*-Zellen

Die Transformation erfolgte streng nach dem Herstellerprotokoll von Stratagene (Agilent Technologie). Transformiert wurden die mutagenisierten und DpnI-verdauten pSN1- und pABRB-Derivate. Die Selektion erfolgte auf den LB-Ap₁₀₀-Platten.

5.2 Gentechnische Methoden

5.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *Bacillus*

Die Bakterienstämme *B. subtilis* 168 und *B. amyloliquefaciens* FZB45 wurden auf der LB-Platte ausgestrichen. 10 ml LB wurden mit einer frischen Kolonie des Bakterienstammes beimpft und über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Isolierung der chromosomalen DNA erfolgte nach der Vorschrift mit dem peqGold Bacterial DNA Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH). Abweichend vom Protokoll war allerdings eine längere Inkubationszeit nach der Zugabe von Lysozym aufgrund der dicken Zellwand von *Bacillus* Stämmen erforderlich. Nach der Zugabe der 100 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in TE) wurden die Zellen zuerst für 10 min auf Eis gestellt und dann für 40 min bei 37°C inkubiert.

5.2.2 Plasmidpräparationen

5.2.2.1 Spin-Plasmidpräparation

Die *E. coli* Transformanten (DH5 bzw. XL10-Gold) wurden in 5 ml LB mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und ÜN bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Plasmide wurden aus *E. coli* - Kulturen mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Kits (Machery Nagel) nach der Anleitung des Herstellers gereinigt. Das Reinigungsprinzip beruht auf einer alkalischen Lyse (NaOH/SDS) und einer Silikagel-Chromatographie. Die Plasmid-DNA wurde unter den niedrigen Ionenbedingungen und mit einem leicht alkalischen Puffer (pH 8,5) eluiert. Eine NucleoSpin-Plasmidpräparation lieferte bis zu 25 µg reiner Plasmid-DNA, die für die analytischen Restriktionen und die Sequenzierungsreaktionen zum Nachweis der positiven Transformanten verwendet wurde.

5.2.2.2 Midi-Plasmidpräparation

Für die Präparation größerer Plasmidmengen aus *E. coli* wurde das NucleoBond Xtra Midi-Kit (Machery Nagel) verwendet, dessen Reinigungsprinzip eine modifizierte alkalische Lyse (NaOH/SDS) und eine Silikagel-Anionenaustauschchromatographie ist. Die Eluierung der Plasmid-DNA erfolgte unter hohen Salzbedingungen und im alkalischen pH-Bereich, um die positive Ladung von Silikagel zu neutralisieren. Eine hohe Anreicherung der reinen Plasmid-DNA stellte optimale Bedingungen für Transformationsexperimente dar. Die Präparation der Midi-Plasmide erfolgte ebenfalls streng nach den Herstellerangaben.

5.2.3 Reinigung der Nukleinsäuren

5.2.3.1 Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Agarose-Gel

Die zu isolierende DNA wurde entweder in einem 0,8 %-igen oder in einem 1,2 %-igen TAE-Agarose-Gel (0,5 µg/ml Ethidiumbromid) getrennt und die gewünschte DNA-Bande mit Hilfe eines DNA-Markers (Tabelle 4.17) unter schwachem UV-Licht (254 nm) mit einem sterilen Skalpell

ausgeschnitten. Die Reinigung der DNA aus der Agarose erfolgte mit dem NucleoSpin Extrakt II Kit nach dem Protokoll des Herstellers (Machery-Nagel).

5.2.3.2 Reinigung der Nukleinsäuren aus wäßrigen Lösungen

NucleoSpin Extrakt II Kit (Machery-Nagel) wurde zur Aufreinigung der PCR-Produkte bzw. zur Entfernung der restlichen dNTPs und Primern (< 50 bp Länge) benutzt. QIAquick Nukleotide Removal Kit bzw. QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) wurden zur Aufreinigung der radioaktiv markierten Oligos (17-40mer) bzw. DNA-Fragmente (> 100 bp Länge) verwendet. Alle Reinigungsschritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.2.4 Bestimmung der Qualität und der Quantität von Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentrationen wurden unter Verwendung des Spektrophotometers Gene Quant II (Pharmacia) bestimmt. Die DNA-Proben wurden 1:50 bzw. 1:100 mit *A. bidest* verdünnt und dessen Absorption bei 260 nm (E_{260}) und bei 280 nm (E_{280}) gemessen.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml}.$$

Das Verhältnis (Ratio) aus E_{260} und E_{280} gab die Auskunft über die Qualität der DNA. Bei einem Quotient von 1,8 konnte von einer reinen proteinfreien DNA ausgegangen werden.

Zusätzlich wurde die DNA mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese auf Konzentration und Reinheit überprüft. Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA wurden je nach DNA-Größe die 0,8 bis 1,5 %-ige Agarosegele in TAE-Puffer mit Ethidiumbromid (0,5 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Die DNA wurde mit 1/6-Volumen von 6 x MassRuler™ DNA Loading Dye versetzt. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt. Die DNA wurde mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht (254 nm) in der Fotodokumentationsanlage GeneGenius und der Software GeneSnap (Synoptics) sichtbar gemacht.

5.2.5 DNA-Restriktionen

Die Restriktionen wurden mit Enzymen und dazu passenden Puffern von Fermentas nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Bei den analytischen Restriktionen wurden die Plasmide nach der NucleoSpin-Plasmidpräparation 1 h lang bei 37°C verdaut und anschließend in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die positiven Transformanten wiesen die richtige DNA-Größe auf. Für präparative Restriktionen wurden 1 μg Plasmid-DNA und 0,2 μg Insert-DNA (PCR-Produkt) entsprechend dem Fermentas-Protokoll, eingesetzt.

5.2.6 Dephosphorylierung der DNA

Um die Religation von geschnittenen Vektoren zu verhindern, wurden die 5'-Enden der DNA mit der thermosensitiven alkalischen Phosphatase dephosphoryliert (entsprechend dem Fermentas-Protokoll). Die Reaktion erfolgte 30 min bei 37°C. Danach wurde der Reaktionsansatz bei 65°C für

15 min inaktiviert und auf Eis gekühlt. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol und NaAcetat gefällt.

5.2.7 Ligation von DNA

Die Ligationen wurden unter Verwendung des Protokolls von Fermentas durchgeführt. Für die Ligationsansätze wurden entweder T4 DNA-Ligase und die dazugehörigen Puffer, oder die Komponenten des Rapid DNA Ligation Kits verwendet. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug im Standard-Ligationsansatz 1:3. Es wurden 50-100 ng Vektor-DNA eingesetzt. Die Menge an Insert-DNA wurde dabei folgendermaßen berechnet:

$$(\text{ng}_{\text{Vektor}} \times \text{kb}_{\text{Insert}}) / (\text{kb}_{\text{Vektor}}) \times \text{molares Verhältnis Vektor : Insert} = \text{ng}_{\text{Insert}}$$

Der Reaktionsansatz wurde in der Regel ÜN bei optimaler Ligationstemperatur von 16° C inkubiert. Die erhaltenen Plasmide wurden anschließend in kompetente Zellen (5.1.2.2; 5.1.2.4) transformiert.

5.2.8 DNA-Fällungen

5.2.8.1 NaAcetat/Ethanol-Fällung

Diese Art der DNA-Fällung wurde nach den enzymatischen Behandlungen von DNA durchgeführt. Der Ansatz wurde auf 100 µl mit *A. bidest* aufgefüllt und dann mit 10 µl einer 3 M NaAcetat-Lösung pH 5,3 und 300 µl 96 %-igem Ethanol versetzt. Der Fällungsansatz wurde vorsichtig gemischt und für mindestens 20 min bei -20°C inkubiert. Das Pelletieren der gefällten DNA erfolgte durch Zentrifugieren für 20 min bei 4° C und 13000 rpm. Das DNA-Pellet wurde durch Zugabe vom kalten 70 %-igen Ethanol und anschließender Zentrifugation gewaschen und dann in SpeedVac-Vakuumentrifuge getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 1 x TE oder *A. bidest* aufgenommen.

5.2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction - PCR)

5.2.9.1 Standard-PCR

Die PCR wurde sowohl zur analytischen Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzen mit der *Taq*-DNA-Polymerase als auch zur präparativen Amplifikation von Genen und Promotorbereichen mit *Pfu*-DNA-Polymerase aufgrund ihrer geringeren Fehlerrate verwendet. Die optimale Temperatur für Annealing (T_a) hängt von der Schmelztemperatur (T_m) des Primers und des amplifizierten DNA-Fragments ab (Rychlik *et al.* 1990). Die Schmelztemperatur T_m wird nach dem einfachen Prinzip aus dem GC-Gehalt des Primers berechnet: $T_m = 4 \times (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \times (\text{Anzahl A bzw. T})$. Die T_m beschreibt, bei welcher Temperatur 50 % des Primers nicht mehr an die DNA-Matrize bindet. Die T_a ist die Temperatur, bei der der Primer zuverlässig hybridisiert (Mülhardt 2009).

Mit Hilfe des DS Gene-Programms wurde das Primerpaar gewählt, das die optimalen Annealing-Temperaturen liefert. Die Synthesedauer ergab sich aus der Länge der zu amplifizierenden DNA

und betrug generell für 1 kb DNA etwa 1 min. Die Standard-PCR wurde in 100 µl Ansätzen durchgeführt.

<u>Standard-PCR-Ansatz</u>		<u>PCR-Programm</u>	
		Temperatur [C°]	Zeit [min]
10-50 ng	Plasmid-DNA bzw.	95	2
20-200 ng	chromosomale DNA		
1 x	<i>Pfu</i> - bzw. <i>Taq</i> -Puffer	95	0,5
100 µM	dNTPs	50-65	0,5
1 µM	<i>forward</i> -Primer	72	1/ kb
1 µM	<i>reverse</i> -Primer	30 Zyklen	
0,1 U/ µl	<i>Pfu</i> - bzw. <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	72	10

5.2.9.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde zur analytischen Amplifikation als Nachweis einer gelungenen Transformation verwendet. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde etwas Material einer frischen *E. coli* Kolonie von der Transformationsplatte in den PCR-Ansatz überführt und dann eine Standard-PCR mit 25 Zyklen durchgeführt. Dafür wurde ein Primer für den Nachweis des Ausgangsvektors und ein anderer für den Nachweis der ligierten Insert-DNA verwendet. 10 µl des Ansatzes wurden im analytischen Agarose-Gel untersucht.

5.2.9.3 Ortsspezifische Mutagenese

Die Ortsspezifische Mutagenese wurde mit dem QuickChange™ II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (Agilent Technologies) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Als Ausgangsplasmide dienten pSN1 (Tabelle 4.3) und pABRB (Tabelle 4.2). Das pSN1-Plasmid wurde für die Mutagenese des *upstream phyC*-Promotorbereiches (ABS1-Stelle) mit dazu gehörenden Primern (Tabelle 4.9) benutzt. Die daraus resultierenden Plasmide waren pSN34-1 (TTAT→GGAG) und pSN34-2 (CCA→GGC) (Neubauer *et al.* 2012). Das pABRB-Plasmid wurde sowohl für die Klonierung der Proteinr AbrBQ81K und AbrBN (Tabelle 4.2; Tabelle 4.6) als auch für die Mutagenese der C-terminalen Domäne des AbrB-Proteins (Tabelle 4.2; Tabelle 7.1) mit den dazu gehörigen Primern (Tabelle 4.8) benutzt. Das eingesetzte Volumen [µl] an Primern wurde aus der Masse [125 ng], der Konzentration [100 µM] und der Molmasse [g/Mol] des dazugehörigen Primers berechnet. Die Mutationen wurden durch die Sequenzierung der isolierten Plasmide (SMB, Berlin) bestätigt. Die mutagenesierten pABRB-Plasmide wurden in die Ca²⁺-kompetente *E. coli* BL21 Zellen transformiert. Die Transformation von pSN34-1 bzw. pSN34-2 erfolgte in die XL10 Gold Zellen.

5.2.10 Konstruktion von Plasmiden und Stämmen

5.2.10.1 pABRB-Plasmidderivate

Die Herstellung von Expressionsplasmiden pABRB und pABRBQ81K (Tabelle 4.2) wurde in Makarewicz *et al.* (2008) beschrieben. Für die Klonierung des verkürzten AbrB-Proteins aus 55 Aminosäuren, auch AbrBN genannt, wurde das Plasmid pABRB55 (Tabelle 4.2) konstruiert (Neubauer *et al.* 2012). Die Konstruktion von pABRB und von dessen Derivaten pABRBQ81K und pABRB55 ist in der Abbildung 7.3 (Anhang) dargestellt. Für die Erzeugung der AbrB-Mutanten wurde die Mutagenese des pABRB Plasmids im C-Terminus mittels QuickChange™ II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (5.2.9.3) vorgenommen.

5.2.10.2 pABBA-Expressionsplasmide

Es wurden zwei Expressionsplasmide pABBABS und pABBABA konstruiert. Mit den entsprechenden Primern (Tabelle 4.7) wurde aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* 168 bzw. *B. amyloliquefaciens* FZB45 das 198 bp lange AbbA-Gen (*yzkF*) amplifiziert (Abbildung 7.1). Das gereinigte 222 bp lange PCR-Produkt wurde mit NdeI und BamHI geschnitten, in den mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisierten pET28a(+) Plasmidvektor (Novagen) ligiert und in DH5 α -Zellen kloniert. Aus den einigen auf diese Weise erhaltenen Transformanten wurden Plasmide mittels NucleoSpin Plasmid Kit (Machery Nagel) isoliert, diese dann über die Restriktion mit NdeI und BamHI auf die Richtigkeit überprüft. Positive Plasmide wurden sequenziert (SMB, Berlin). Aus einem der positiven Klone (DHABBABS168 bzw. DHABBAFZB45) wurde das Klonierungsplasmid mit Hilfe NucleoBond Xtra Midi Kit (Machery Nagel) gewonnen und in die elektrokompente *E. coli* BL21 (C43)-Zellen transformiert.

5.2.10.3 pSN1-Plasmide

Für die Konstruktion des pSN1-Plasmids (Abbildung 7.5) wurde pDG268 als Ausgangsvektor verwendet (pDG268 von Antoniewski *et al.* (1990)). Das Chloramphenicolresistenzgen und die *cloning site* liegen vor dem kompletten *lacZ*-Gen, die von *amy*_{front}⁻ und *amy*_{back}⁻-Regionen eingeschlossen sind. Das *phyC*-Promotorfragment wurde aus der chromosomalen DNA von *B. amyloliquefaciens* FZB45 mit den Primern Sn4EcoRI und Om09BamHI (-392 bis +221, Position relativ zum Transskriptionsstart) mit der *Pfu*-Polymerase amplifiziert und nach der Restriktion mit EcoRI und BamHI in den geschnittenen pDG268-Vektor ligiert. Eine Ampicillinresistenz ermöglichte die Klonierung von pSN1 in die kompetenten DH5 α -Zellen. Die erhaltenen Transformanten wurden zur Kontrolle mit EcoRI und BamHI verdaut. Je ein Klon wurde für die Midi-Plasmidpräparation ausgewählt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde mit den Primern Om03 (spezifisch für *lacZ*-Gen) und Sn4EcoRI sequenziert.

5.2.11 Markierung der DNA

Für die chemische Interferenz-Footprints wurden die einzelnen Primer wie Sn4- bzw. Sn3 für die Herstellung der AbrB-Bindungsstelle 1 (ABS1 im *upstream*-Bereich von -392 bis -185) und F3for bzw. F3rev für die Herstellung der AbrB-Bindungsstelle 2 (ABS2 im *downstream*-Bereich von -25 bis +131) markiert. Dafür wurde am 5'-Ende eines Primers mittels T4-Polynukleotidkinase (PNK) ein radioaktives Phosphat angehängt (nach Vorschrift von Fermentas). Dazu wurden 20 pmol Primer und 40 µCi [γ - 32 P]-ATP im 20 µl Ansatz verwendet. Mit dem gesamten Markierungsansatz und dem entsprechenden korrespondierenden kalten Primer (20 pmol) wurde anschließend eine Standard-PCR unter Verwendung von 100 ng gereinigter DNA-Matrize (DNA-Fragmente: Tabelle 4.10) durchgeführt.

Für die Gelretardationsassay wurden solche DNA-Fragmente wie FFL3, FFL4 und *sinIR*-AbrB-Bindungsstelle (Tabelle 4.10) am 5'-Ende direkt über eine *Exchange*-Reaktion (Fermentas-Protokoll) markiert. Dafür wurden 5 pmol DNA und 15-20 pmol [γ - P^{32}]-ATP im 20 µl Ansatz verwendet. Die markierten DNA-Fragmente wurden, wie oben unter 5.2.3.2 beschrieben, gereinigt und ihre radioaktive Quantität in Szintillationszähler (Packard) bestimmt. Dazu wurde 1 µl der gereinigten DNA in 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Zinsser Analytik) aufgenommen und die radioaktive Zerfälle/min (cpm/µl) gezählt.

5.2.12 Gelretardationsassay

5.2.12.1 Analytische Gelretardationsassay

Für die Bindungsreaktionen wurden unterschiedlich lange, radioaktiv 32 P-markierte DNA-Fragmente (Tabelle 4.10) aus den *phyC*- und *sinIR*- Promotorbereichen, sowie Proteine wie AbrB, AbrB-Mutanten und AbbA in verschiedenen Konzentrationen ausgewählt. Für Mutagenese-Analysen wurden ein 440 bp großes FFL3-DNA-Fragment relativ zu der *phyC*-Promotorregion (-333 bis +107) in einer Konzentration von 1,14 nM (10000 cpm/µl) bzw. eine *sinIR*-AbrB-Bindungsstelle relativ zu der *sinIR*-P1-Promotorregion (+20 bis +55) in einer Konzentration von 0,95 nM (10000 cpm/µl) pro Ansatz verwendet. Die *sinIR*- ABS wurde aus den einzelsträngigen, komplementären Oligonukleotiden SinIRAbrBfor und SinIRAbrBrev (Eurofins MWG Operon) abgeleitet. Für die AbbA-Bindungsassays (Kontrolle) wurde ein 523 bp langes FFL4-DNA-Fragment (-392 bis +131; 0,37 nM; 12000 cpm/µl) aus dem *phyC*-Promoterbereich verwendet.

Die Bindung der Proteine an DNA erfolgte in 1 x Bindungspuffer bei 37° C für 15 min. Die Ansätze wurden in einem nativen 6 %- bzw. 10 %-igen Acrylamid/ 1 x TBE-Gel in der Mini-Protean 3 (Biorad) Elektrophoresezelle bei 100 V für 30-90 min je nach Fragmentgröße getrennt. Die Gele wurden dann 20 min unter Vakuum bei 80° C getrocknet, für 1 h auf eine Phosphoscreen-Platte (Kodak) exponiert und im FX-ProPlus Phosphoimager (BioRad) eingescannt.

5.2.12.2 Präparative Gelretardationsassay

Die ^{32}P -markierte DNA (Kapitel 5.2.11) wurde mit den Chemikalien wie Dimethylsulfat (DMS), Kaliumpermanganat (KMnO_4) und Hydroxylamin (NH_2OH) für die chemische Interferenz-Footprinting modifiziert (Kapitel 5.2.14). Die modifizierte DNA (200000 cpm) wurde mit dem AbrB-Protein gemischt und bei 37°C für 15 min inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde dabei so gewählt, dass die DNA zur Hälfte gebunden vorlag. Die Ansätze wurden in einem nativen 6 %-igen Acrylamid/ 1 x TBE-Gel in der Mini-Protean 3 (Biorad) Elektrophoresezelle bei 100 V für 45 min aufgetrennt. Die Gele wurden ohne zu trocknen von der Frischhaltefolie beiderseits vorsichtig verschlossen, für 30 min auf eine Phosphoscreen-Platte (Kodak) exponiert und im FX-ProPlus Phosphoimager (BioRad) eingescannt. Das ausgedruckte Bild, das die resultierenden DNA-Banden enthielt, wurde an die Größe der kleinen bzw. der großen Glasplatte von Mini-Protean 3 (Biorad) angepasst und unter der Folie, auf dem das Gel sich befand, gelegt. Mit Hilfe des Bildes konnten sowohl die gebundenen als auch die ungebundenen DNA-Banden ausgeschnitten und die entsprechenden Gelstücke in Tubes überführt werden. Die Isolierung der DNA erfolgte durch Diffusion in 150 μl Eluierungspuffer (Tabelle 4.18), indem die Proben in einem Thermomixer zweimal jeweils eine Stunde bei 37°C geschüttelt wurden. Der Überstand wurde anschließend mit 1/10 Volumen 3 M NaAcetat (pH 5) und 3 Volumenteilen kaltem 98 %-igen Ethanol bei -20°C für 2 h gefällt, gewaschen und getrocknet. Die DNA-Pellets wurden, wie im Kapitel 5.2.14 beschrieben, weiter behandelt.

5.2.13 *In vitro* Transkription

Für die Transkriptionsreaktion wurde eine DNA verwendet, die mittels PCR mit den entsprechenden Primern amplifiziert und mit dem NucleoSpin Extrakt II Kit gereinigt wurde. Für die PhoP-Phosphorylierung wurden 12,5 μM PhoP mit 0,3 μM PhoR231 und 10 mM ATP (100 mM) in 1 x Bindungspuffer gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Der Transkriptionsgemisch wurde mit 10 nM *phoC*-DNA (F2for/Omo9-PCR-Produkt), 100 nM RNAP, 125 nM PhoP~P (aus der Phosphorylierungsreaktion) in 1xTranskriptionspuffer angesetzt. Eine konstante AbrB-Konzentration von 650 nM und die verschiedenen Konzentrationen (0,25 nM bis 10 nM) vom ABS1- Fragment (PCR-Produkt von Sn4/Sn3) wurden dem Transkriptionsgemisch zugefügt. Die Transkription wurde durch Zugabe von 4 μl des NTP-Gemisches (0,6 mM UTP, 4 mM ATP/GTP/CTP und 2 μCi [α - ^{32}P]-UTP) mit 0,8 μl RNase Block (32 U) gestartet und lief dann 20 min bei 37°C . Die Reaktion wurde mit 5 μl Stopp-Solution gestoppt und 10 μl des Reaktionsansatzes auf ein 6 %-iges Acrylamid/ 7 M-Harnstoff/ 1 x TBE-Gel beladen. Der Gellauf wurde mit 50 W für 90 min durchgeführt. Das fertige Gel wurde auf ein Filterpapier abgezogen, getrocknet und auf eine Phosphoscreen-Platte $\ddot{\text{U}}\text{N}$ exponiert. Die Detektion erfolgte im FX-ProPlus Phosphoimager (BioRad).

5.2.14 Chemische Interferenz-Footprintanalyse

5.2.14.1 Grundlagen der Modifikation von Guanin und Adenin mittels Dimethylsulfat

Die Modifizierung der 5'-markierten *phyC*-Promotorfragmente an ihren Purinbasen, dem Guanin und dem Adenin, erfolgte mittels Dimethylsulfat (DMS) nach Maxam und Gilbert (Maxam *et al.* 1977, Maxam *et al.* 1980).

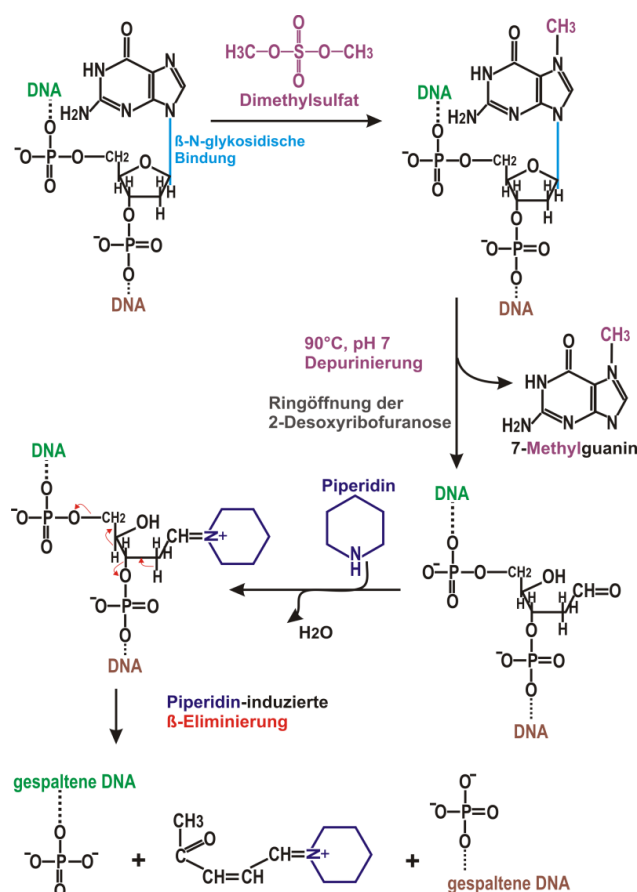


Abbildung 5.1: Chemischer Weg der Methylierung von Guanin mit Dimethylsulfat, die Depurinierung und die durch Piperidin induzierte β-Eliminierung.

Der chemische Weg und die Abbildung wurden aus den Publikationen von Maxam und Gilbert (Maxam *et al.* 1977, Maxam *et al.* 1980) übernommen und in dieser Arbeit modifiziert dargestellt.

Die Guanine werden durch DMS fünffach schneller methyliert als die Adenine. Die N-glykosidische Bindung des methylierten Purins ist instabil, diese wird durch das Erhitzen (bei 90° C für 15 min) in einem neutralen Puffer (T-Puffer: 20 mM NH₄Acetat pH 7,0 und 0,1 mM EDTA) leicht gespalten (Abbildung 5.1). Nach der Spaltung erfolgt sowohl die Freisetzung von 7-Methylguanin bzw. 3-Methyladenin, als auch die Öffnung der 2-Desoxyribofuranose. Der geöffnete Zuckerring wird dadurch zu einer schwachen Stelle und ist für den Piperidin-Angriff leicht zugänglich. Das N-Atom des Piperidins (Elektronenpaardonator) greift die Aldehydgruppe der Desoxyribose nukleophil an. Dabei wird das O-Atom der Aldehydgruppe durch das N-Atom des Piperidins ersetzt (nukleophile Substitution). Als Nächstes erfolgt die durch Piperidin induzierte β-Eliminierung, die beim

anschließenden Erhitzen die Spaltung des Zucker-Phosphat-Rückgrats an modifizierten Stellen und somit die endgültige Freisetzung von 2-Desoxyribofuranose verursacht (Maxam *et al.* 1980).

Die DNA wurde an ihren Purinresten modifiziert, bevor sie der Bindung mit dem Protein unterzogen wurde. Das Adenin wurde an der N3-Position in der kleinen Furche und das Guanin an der N7-Position der großen Furche modifiziert. Die Methylierung störte die Bindung des Proteins an die Purin-Reste und ermöglicht somit die Identifizierung der Kontaktstellen innerhalb der Protein-Bindungsregionen (Siebenlist *et al.* 1980, Licht *et al.* 2006).

5.2.14.2 Interferenz-Footprinting durch Methylierung

Das Pellet der ^{32}P -markierten DNA (Kapitel 5.2.11) von 2×10^6 cpm wurde in 200 μl DMS-Puffer (Tabelle 4.18) gelöst und mit 14 μl Calf Thymus DNA (10 mg/ml) versetzt. Die Methylierung wurde durch die Zugabe von 1 μl Dimethylsulfat (Sigma Adrich) gestartet und erfolgte bei 30° C für 4 min. Die nähere Beschreibung zum Prinzip der Methylierung und die Abbildung dazu wurde im Kapitel 5.2.14.1 dargestellt. Die Reaktion wurde mit 50 μl G-Stopplösung gestoppt und die DNA-Proben mit 1 ml 96 %-igem Ethanol bei -20° C für 2 Stunden gefällt. Nach der Zentrifugation (4° C, 15 min, 13000 rpm) wurden die Pellets in 100 μl 0,3 M NaAcetat gelöst und nach der Zugabe von 1 ml 96 %-igem Ethanol wieder gefällt. Nach der Zentrifugation wurden die Pellets im Thermoblock (Eppendorf) bei 37° C getrocknet und anschließend in *A. bidest* gelöst. Die modifizierte DNA war mit AbrB gemischt und anschließend der präparativen Gelretardationsassays (Kapitel 5.2.12.2) unterzogen.

Die Pellets der zu untersuchenden DNA-Proben und der proteinfreien DNA-Probe (Kontrolle) waren in T-Puffer (Tabelle 4.18) gelöst und bei 90° C für 15 min im Wasserbad gekocht. Die Proben wurden anschließend auf Eis gekühlt, mit 11 μl Piperidin versetzt und für weitere 30 min bei 90° C gekocht. Nach Zugabe von 1 μl Glykogen (10 mg/ml) und 10 μl 3 M NaAcetat (pH 5) wurden die Reaktionsgemische zweimal mit 96 %-igem Ethanol gefällt. Die Pellets wurden in 20 μl Stopp-Lösung (Ladepuffer mit Formamid; Tabelle 4.18) resuspendiert und die radioaktive Zerfälle/min (cpm/ μl) vermessen. Die Proben wurden zu dem gleichen cpm-Anteil (mindestens 5000 cpm) auf ein 6 %-iges Acrylamid/ 7 M-Harnstoff/ 1 x TBE-Gel beladen und der Gellauf bei 50 W für 90 min mit dem SequiGen Elektrophoresekammer (21x50 cm; Biorad Laboratories Inc.) durchgeführt. Das Gel wurde anschließend auf das dünne Filterpapier abgezogen, getrocknet und auf eine Phosphoscreen-Platte über Nacht exponiert. Die Detektion erfolgte im FX-ProPlus Phosphoimager (BioRad).

5.2.14.3 Grundlagen der Modifikation der Thymine mittels Kaliumpermanganat

Die Modifizierung mit Kaliumpermanganat (KMnO_4) diente dazu, die Bindung von Protein an die Thyminreste der DNA zu überprüfen (Licht *et al.* 2006). KMnO_4 ist ein starkes Oxidationsmittel, es oxidiert Thymine spezifisch und verhindert dadurch die Bindung an Proteinen. Das KMnO_4 zeigt

auch eine schwächere Reaktivität mit den anderen Basen ($dT \gg dC > dG, dA$) und verursacht hauptsächlich einen schwachen Hintergrund bei C- und G-Resten auf dem Gel (Rubin *et al.* 1980). Die Reaktivität von $KMnO_4$ hängt stark von der Sekundärstruktur der DNA ab. Die doppelsträngige DNA wird sehr schwach und nur bei den hohen $KMnO_4$ -Konzentrationen attackiert, während die einzelsträngige DNA schon bei den niedrigen $KMnO_4$ -Konzentrationen und einem neutralen pH-Wert stark modifiziert wird (Hayatsu *et al.* 1967). Aus diesem Grund erfolgte die Modifizierung der DNA unter den ungepufferten Bedingungen, mit einem niedrigen Ionengehalt, wodurch eine Basenpaar-Denaturierung kinetisch und thermodynamisch begünstigt wurde. Einige T-Positionen in einem DNA-Strang wurden effektiver modifiziert als die anderen, wodurch sich ein Gel-Muster aus den schwachen und starken Thymin-Basen ergab. Dieser Effekt kann aufgrund der Ausbildung von einigen Sekundärstrukturen innerhalb der denaturierten Einzelstränge aufgetreten sein (Rubin *et al.* 1980).

Bei der Oxidation der 5,6-Doppelbindung der Thyminbase mit dem Permanganat unter den milden Bedingungen (pH 7,0) werden Produkte wie Thyminglykol (5,6-Dihydroxy-5,6-Dihydrothymin) und 5-Hydroxy-5-Methyl-Barbitursäure gebildet (Abbildung 5.2). Keiner von diesen Produkten ist ein Zwischenprodukt des anderen, beide Komponenten werden direkt aus dem Thymin geformt. Das Produkt 5-Hydroxy-5-Methyl-Barbitursäure-Desoxyribosid hydrolysiert leicht aufgrund der tertiären Amid-Struktur an der N1-Position. Dabei wird der Ring zwischen N1 und C6 gespalten und N-(2-Desoxy-D-Ribofuranosyl)-N'-Methyltartronylurea gebildet. Die Dephosphorylierung von der N-(2-Desoxy-D-Ribofuranosyl-3'-/5'-Phosphat)-N'-Methyltartronylurea und dem Thymidinglykol-Phosphat erfolgt unter basischen Bedingungen bei einer hohen Temperatur (Iida *et al.* 1971).

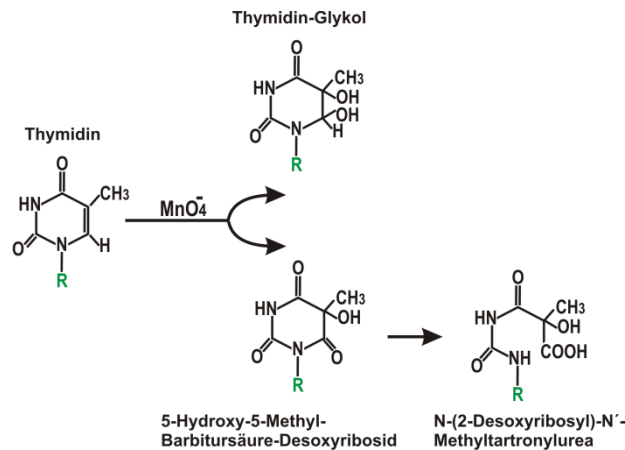


Abbildung 5.2: Produkte bei der Permanganat-Oxidation von Thymidin.

R = 2-Desoxyribose oder 2-Desoxy-D-Ribofuranosyl-3'-/5'-Phosphat. Die Abbildung stammt von Iida *et al.* (1971).

5.2.14.4 Interferenz-Footprinting durch Kaliumpermanganat

Die Modifizierung der ^{32}P -markierten DNA (5.2.11) erfolgte durch Kaliumpermanganat ($KMnO_4$, VEB Laborchemie Apolda), wie durch Rubin und Schmid (1980) beschrieben. Zu den 5 μ l der markierten DNA (2×10^6 cpm) wurden 5 μ g der unmarkierten, unspezifischen DNA (Calf Thymus DNA) zugegeben. Der DNA-Ansatz wurde bei 90° C für 2 min gekocht und sofort auf Eis kurz abgekühlt.

Die Modifizierung wurde durch die Zugabe von 20 µl einer 125 µM KMnO₄-Lösung gestartet und der Ansatz dann bei 20° C für 10 min inkubiert. Die in *A. bidest* hergestellte 125 mM KMnO₄-Stocklösung konnte kühl und dunkel eine Woche lang stabil gelagert werden. Die Modifizierungsreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl KMnO₄-Interferenz-Stopplösung unterbunden (die Reaktion der Permanganat-Oxidation mit ihren Produkten wurde unter 5.2.14.3 genauer beschrieben bzw. graphisch dargestellt).

Der Probenansatz wurde in 125 µl aufgenommen und in 600 µl 96 %-igem Ethanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 3 M NaAcetat (pH 5) gelöst und erneut mit 96 %-igem Ethanol gefällt. Nach der Zentrifugation wurden die Pellets im Thermoblock (Eppendorf) bei 37° C getrocknet und in *A. bidest* gelöst. Anschließend erfolgte die AbrB-Bindung sowie die präparativen Gelretardationsassays (5.2.12.2) der modifizierten DNA. Die Pellets der zu untersuchenden DNA-Proben und das der proteinfreien DNA-Probe (Kontrolle) wurden in 100 µl *A. bidest* gelöst, mit 11 µl Piperidin versetzt und bei 90° C 30 min gekocht. Nach der Zugabe von 1 µl Glykogen (10 mg/ml) und 11 µl 3 M NaAcetat (pH 5) war es erforderlich die Reaktionsgemische noch zweimal mit 400 µl 96 %-igem Ethanol zu fällen. Die weiteren Schritte erfolgten wie bereits im Kapitel 5.2.14.2 beschrieben.

5.2.14.5 Grundlagen der Modifikation der Cytosine mittels Hydroxylamin

Die Modifizierung mit dem Hydroxylamin (NH₂OH) diente dazu, die Bindung von Protein an die Cytosinreste zu untersuchen. Das Hydroxylamin ist ein starkes Reduktionsmittel. Es verursacht speziell an den Cytosinresten eine Ringöffnung und verhindert auf diesem Wege eine Kontaktausbildung zwischen dem Protein und der DNA (Licht *et al.* 2006). Das Hydroxylamin ist spezifisch für die Cytosinreste bei pH 6. Während das Uridin ziemlich reaktiv mit dem NH₂OH bei pH 10 ist, bleibt das Thymin gegenüber diesem Reagenz bei allen pH-Werten reaktionsträge (Phillips 1967). Das NH₂OH wird an die 5,6-Doppelbindung von Cytosin und Uridin addiert, wodurch der Ring zu einer internen Neuordnung und der Spaltung gebracht wird (Kochetkov *et al.* 1972). Die Hydroxylamin-Reaktion mit Uridin ist ähnlich der von Hydrazin, diese Reaktion mit dem Reaktionspartner Cytosin, liefert das N4-Hydroxyaminocytidin als Produkt (Phillips 1967).

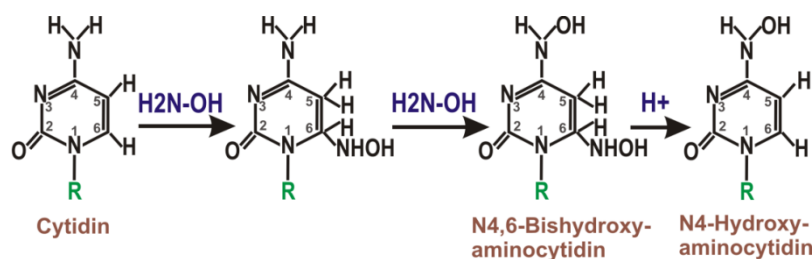


Abbildung 5.3: Modifizierung von Cytosin durch Hydroxylamin (NH₂OH).
 R = 2-Desoxyribose oder 2-Desoxy-D-Ribofuranosyl-3'-/5'-Phosphat (Phillips 1967).

5.2.14.6 Interferenz-Footprinting durch Hydroxylamin

Die ^{32}P -markierte DNA (5.2.11) konnte durch Hydroxylamin (NH_2OH), wie durch Rubin *et al.* (1980) beschrieben, modifiziert werden. $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (Sigma Aldrich) lag als eine 4 M Stocklösung vor, wobei ein pH-Wert von 6,0 mit Diethylamin eingestellt wurde. Diese Stocklösung konnte eine Woche lang kühl gelagert werden. Zu den 5 μl der markierten DNA (2×10^6 cpm) wurden 5 μg der unmarkierten, unspezifischen DNA (Calf Thymus DNA) zugegeben. Der DNA-Ansatz wurde bei 90°C für 2 min gekocht und dann sofort auf Eis kurz abgekühlt. Die Modifizierung wurde durch die Zugabe von 20 μl einer 4 M NH_2OH -Lösung und eine 10-minutige Inkubation des Reaktionsansatzes bei 20°C gestartet.

(Die Modifizierung von Cytodin und Hydroxylamin mit dazugehöriger Produktausbildung wurden im unter 5.2.14.5 ausführlich beschrieben). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 170 μl NH_2OH -Interferenz-Stoppplösung unterbunden und das DNA-Pellet in 600 μl 96 %-igem Ethanol gefällt. Das gewonnene DNA-Pellet wurde in 3 M NaAcetat (pH 5) aufgenommen und erneut mit 96 %-igem Ethanol gefällt. Nach der Zentrifugation wurden die Pellets bei 37°C getrocknet und in *A. bidest* gelöst. Die weitere Behandlung der auf diese Weise vorbereiteten Proben einschließlich der AbrB-Bindung und der präparativen Gelretardationsassays (5.2.12.2) erfolgte wie oben in Abschnitt 5.2.14.2 beschrieben.

5.3 Biochemische Methoden

5.3.1 Reinigung der Proteine

5.3.1.1 Zellaufschluss mit Ultraschall

Sowohl *E. coli*- als auch *Bacillus*-Zellen wurden mittels Ultraschallsonde entweder mit Schallkopf MS73 für kleine Proteinpräparationen (~ 2 ml Volumen), oder mit Titanteller TT13 für große Proteinpräparationen (~ 10 ml Volumen) aufgeschlossen. Dabei wurden die Zellsuspensionen auf Eis gekühlt und bei einer Intensität von bis zu 80 % und mit einem Zyklus von 50 beschallt. Nach jeweils 30 Bursts wurde eine 30-sekündige Pause eingelegt. Dies wurde so lange wiederholt, bis die Zellsuspension eine gräulich opalisierende Farbe aufwies. Um den proteolytischen Verdau zu unterbinden, wurde vor dem Aufschluss PMSF bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Der Suspension aus *Bacillus*-Zellen wurde zusätzlich Lysozym (1 mg/ml) zugesetzt.

5.3.1.2 Reinigung His-getaggtter Proteine mittels Qiagen Ni^{2+} -NTA-Agarose

Das Prinzip der Aufreinigung von poly-Histidin-getaggtten Proteinen beruht auf der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie. Die Ni^{2+} -Metallionen sind über die Nitrilotriessigsäure (NTA) an eine Agarosematrix gebunden. Über die Ni^{2+} -Metallionen ermöglichte die NTA als Chelatbildner die Interaktionen mit zwei His_6 -Tags der rekombinanten Proteinen. Die Gene der zu exprimierenden Proteinen wurden in die Vektoren (Tabelle 4.2; Kapitel 5.2.10) einkloniert und

trugen einen N- bzw. C-terminalen Tag aus sechs Histidinresten. Das gebundene Protein konnte durch Imidazol kompetitiv von der Säule verdrängt werden.

Bei großen Proteinpräparationen wurden 15 ml Polypropylen-Säulen (Qiagen) mit 0,5 ml – 1,5 ml der Ni^{2+} -NTA-Agarose befüllt und mit dem Reinigungspuffer (Tabelle 5.1) des 5-fachen Säulenvolumens äquilibriert. Die Säule wurde nach dem Beladen mit der Proteinlösung für 2 h bei 4° C leicht gewippt. Nach dem Durchlaufen der Säule wurde diese mit dem Waschpuffer (Tabelle 5.1) so lange gewaschen, bis keine Proteine im Durchlauf mehr nachzuweisen waren. Danach erfolgte die Waschung der Säule mit 10 – 100 mM Imidazol mit anschließender Elution durch Einsatz einer hochkonzentrierten Imidazol-Lösung (300 –450 mM). Die 2 M Imidazol-Stocklösung wurde mit dem entsprechenden Reinigungspuffer hergestellt und auf dem Puffer entsprechenden pH-Wert eingestellt. Bei der Elution wurden Fraktionen in 500 µl Mengenvolumen gesammelt. Alle Reinigungsfraktionen (Durchlauf, Waschschrirte mit und ohne Imidazol) und Eluate wurden mithilfe der SDS-PAGE (Anhang: Kapitel 7.2.4) analysiert, wobei die sauberen Proteinfractionen anschließend einer Dialyse unterzogen wurden (Kapitel 5.3.1.6).

Tabelle 5.1: Anwendung unterschiedlicher Pufferbedingungen bei Proteinreinigung

His ₆ -Tag-Protein	Reinigungspuffer (0 mM Imidazol)	Waschpuffer mit Imidazol	Elutionpuffer mit Imidazol
PhoP	Sonifikationspuffer (50 mM TrisHCl (pH 7,5), 5 mM MgSO ₄ , 1 M NaCl)	10 und 50 mM	300 mM
PhoR	B-Puffer (10 mM TrisHCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 20 % Glycerin)	10 und 50 mM	300 mM
AbrB	50 mM TrisHCl bzw. HEPES (pH 7,4), 300 mM NaCl, 2 mM β-Mercaptoethanol, 10 % Glycerin	30, 50 und 100 mM	350 mM
AbbA	50 mM TrisHCl (pH 7,4), 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 % Glycerin	30, 50 und 100 mM	450 mM

5.3.1.3 Reinigung His-getaggtter Proteine mittels Protino Ni-TED 1000

Nach der ersten Reinigung über die Ni^{2+} -NTA-Agarose wurden die dialysierten Proteine einer zweiten Reinigung über die Protino Ni-TED 1000 (Macherey-Nagel) unterzogen. Dieses Reinigungsprinzip beruht ebenfalls auf der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie, jedoch mit TED (Tris (Carboxymethyl) Ethylen-Diamin) als eine chelatbildende Gruppe, die im Gegensatz zu NTA ein His₆-getaggttes Protein bindet. Die Reinigung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll unter Anwendung verschiedener Pufferbedingungen (Tabelle 5.1) wie oben unter 5.3.1.2 beschrieben. Die Analyse einzelner Wasch- und Eluatfraktionen erfolgte mittels SDS-

PAGE (Anhang: Abbildung 7.7 C, D und Abbildung 7.8), wobei die saubersten Eluate gepoolt und je nach Protein und geplantem Experiment unter der Anwendung bestimmter Dialysepuffer (Kapitel 5.3.1.6) dialysiert wurden. Die Proteine wurden dann über die VivaSpins (15 bzw. 30 kDa) von Sartorius oder Amicon Ultra 15 Zentrifugenfilter (30 bzw. 50 kDa) von Millipore nach Angaben der Hersteller ankonzentriert.

5.3.1.4 Proteinreinigung durch präparative Gelfiltration mittels FPLC

Die Proteine AbrB und AbbA wurden nach der zweiten Reinigung über die Protino Ni-TED 1000 zusätzlich einer präparativen Gelfiltration unterzogen. Auf diese Weise wurden diese Proteine für SAXS- und CD-Messungen vorbereitet. Es wurde eine präparative Säule Superdex 200 benutzt, die vor dem Beladen mit dem dafür vorgesehenen Puffer (Tabelle 4.18) voräquilibriert wurde. Dieser Puffer wurde auch als Laufmittel verwendet, während die Flussrate 0,2 ml/min betrug. Die Proteinprobe wurde vor dem Beladen zuerst auf ein Volumen von 500 µl mittels VivaSpins (15 und 30 kDa) von Sartorius ankonzentriert. Es wurden 100 bzw. 200 µl Fraktionen gesammelt und der Säulenlauf durch UV-Detektion bei 280 nm verfolgt und dokumentiert. Das Chromatogramm der Proteinläufe (Anhang: Abbildung 7.9) zeigte die graphische Auftragung der Absorption [mAU] gegen das Retentionsvolumen [ml] der mobilen Phase (nähere Beschreibung unter 5.3.2.3). Die gesammelten Proteinfractionen der richtigen Molekülmasse, die mit Hilfe der Eichung von Standard-Proteinen und aufgrund der Retentionsvolumina der Proteine bestimmt wurde, wurden im SDS-PAGE (Anhang: Abbildung 7.10) analysiert und die sauberen von denen vereinigt. Die AbbA- und AbrB- Proteine wurden anschließend über die VivaSpins (15 bzw. 30 kDa) von Sartorius nach dem Herstellerprotokoll ankonzentriert.

5.3.1.5 Reinigung der RNA-Polymerase

Das Zellpellet von *B. subtilis* MF1 (Kapitel 5.1.2.1) wurde in 5 ml G-Puffer (+1 mg/ml Lysozym) aufgenommen und mit Ultraschall (Kapitel 5.3.1.1) aufgeschlossen. Nachdem die Zelltrümmer pelletiert wurden, erfolgte die Reinigung über eine voräquilibrierte Ni²⁺-NTA Agarosesäule (Qiagen). Die Säule wurde zuerst mit G-Puffer (Tabelle 4.18) gewaschen, bis keine Proteine mehr im Durchlauf detektiert werden konnten. Das 2 M Imidazol wurde als Stocklösung im G-Puffer gelöst und auf pH 8,0 titriert. Als nächstes wurde die Säule zunächst mit 20 ml 10 mM Imidazol, dann mit 10 ml 30 mM Imidazol gewaschen, während die Elution des Enzyms mit 500 mM Imidazol erfolgte. In der 10 %-iger SDS-PAGE (Anhang: Abbildung 7.6) konnte man die einzelnen Komponenten erkennen: die β - und β' -Untereinheiten mit 150 kDa Proteingröße, α -Untereinheit mit 53 kDa und den assoziierten σ^A -Faktor mit 55 kDa. Die relative Molekülmasse des ganzen RNAP-Holoenzym betrug 340 kDa. Die RNAP-Konzentration dieser Reinigung betrug 733,3 µg / ml (2,16 µM). Die gereinigte RNAP wurde bei *in vitro* Transkription auf ihre Aktivität (Anhang: Abbildung 7.20) überprüft. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen von RNAP und konstante Konzentration von PhoP~P (Transkriptionsaktivator) im Transkriptionsgemisch angesetzt. Die weiteren Schritte der *in vitro* Transkription erfolgten wie bereits im Kapitel 5.2.13 beschrieben.

5.3.1.6 Dialyse von Proteinlösungen

Das Umpuffern oder das Entsalzen von Proteinlösungen erfolgte durch Dialyse. Dafür wurde ein Dialyseschlauch (12 – 16 kDa Membran-Ausschlussgröße), oder bei kleineren Proben eine Mikro-Dialysierkapsel (QuixSep Roth) verwendet. Der Dialyseschlauch wurde 5 min im kochenden Wasser äquilibriert und nach dem anschließenden Abkühlen verwendet. Die saubersten Proteinfractionen wurden zusammengemischt und unter Verwendung der beschriebenen Puffer (Tabelle 4.18) dialysiert. Die Dialyse von dem 5 ml Proteinfractionsvolumen erfolgte im ersten Schritt über Nacht und im zweiten Schritt tagsüber in jeweils 2 Litern des gleichen Puffers.

5.3.2 Proteinbestimmung

5.3.2.1 Bestimmung nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde zunächst das Bradfordreagenz RotiQuant (Carl Roth) nach Herstellerangaben mit *A. bidest* verdünnt. Das Gesamtvolumen der Proteinprobe betrug 50 µl und wurde mit vorgelegten 200 µl Bradford-Fertigreagenz in 96-Well-Mikrotiterplatten gemischt. Dazu wurde die Eichung mit den bekannten BSA-Konzentrationen (0 mg/ml bis 2 mg/ml) vorgenommen und daraus der Extinktionskoeffizient ermittelt. Die Bestimmung der Extinktionen sowohl von BSA als auch von den Proteinproben erfolgte bei 595 nm im Ascent-Plattenreader. Die Differenz der Extinktionen (Probe und Nullwert) wurde durch den ermittelten Extinktionskoeffizient geteilt, um die Konzentration der Proteine zu berechnen.

5.3.2.2 UV-Proteinbestimmung bei 280 nm (NanoDrop)

Die UV-Proteinbestimmung erfolgte am NanoDrop UV-Spektralphotometer (ND2000, Peqlab Biotechnology) und beruhte auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan und auch im geringen Maße Phenylalanin bei 280 nm Wellenlänge. Die Proteinprobe wurde in einem kleinen Volumen von 2 µl unverdünnt auf die Messfläche pipettiert. Als Referenz wurde der dazugehörige Dialysepuffer verwendet. Es wurde ein Proteinspektrum zwischen 220 nm und 350 nm aufgenommen. Die Konzentrationsberechnung der Proteine erfolgte automatisch mit Hilfe der bereits bekannten Parameter des Proteins, solchen wie der Extinktionskoeffizient und die Molekulare Masse (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Übersicht der Protein-Parameter für UV-Konzentrationsbestimmung

Protein	AS-Anzahl mit His ₆ -Tag	AS-Anzahl nach Thrombin- verdau	Aromatische AS	m _M [kDa]* (nach Thrombin- verdau)	m _M [kDa]* (mit His ₆ -Tag)	Extinktions- koeffizient
AbbA BA	85	68	3 Tyr, 2 Phe	7,96	9,84	3,84
AbbA BS	85	68	3 Tyr, 3 Phe	7,89	9,77	3,84
AbrB BA	114	97	2 Tyr	10,76	12,64	2,56
AbrB BS	114	97	2 Tyr	10,76	12,64	2,56
AbrB N	75	58	2 Tyr	6,59	8,48	2,56

* m_M ist die molekulare Masse mit der Masseinheit Dalton [Da] (Voet *et al.* 2002). Die Einheit Da (Dalton) ist atomare Masseinheit, worunter man den zwölften Teil der Masse des Kohlenstoffisotops ¹²C versteht. Bei der Berechnung der molekularen Masse wurden die Massen der einzelnen Aminosäuren der AS-Sequenz des Proteins berücksichtigt (Voet *et al.* 2002). Der AS-Austausch in AbrB-Protein aus *B. subtilis* hatte eine geringe Auswirkung auf die molekulare Masse (Tabelle 7.2).

5.3.2.3 Bestimmung der molekularen Masse mittels analytischer Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration diente vor allem dazu, die molekulare Massen und die daraus resultierenden polymeren Zustände der AbrB-Varianten zu bestimmen. Auf einer voräquilierten Superdex™ 75-Säule mit einem Chromatographie-Bett-Volumen von 3 ml wurden 100 µl der gereinigten Proteine (100-500 µg) aufgetragen. Der Säulenlauf erfolgte mit einem ÄKTA FPLC (*fast protein liquid chromatography*) -System (Unicorn 5.11) von GE Healthcare bei RT unter der Verwendung des FPLC_{AbrB}-Puffers (50 mM HEPES pH 7,4, 300 mM NaCl, 2 mM β-Mercaptoethanol, 10 % Glycerin) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,2 ml/ min. Das Retentionsvolumen wurde durch UV-Detektion bei 280 nm dokumentiert. Das Chromatogramm zeigte eine graphische Auftragung der Absorption [mAU], die am Ende der stationären Phase (also am Säulenausgang) gemessen wurde, gegen das Retentionsvolumen [ml] der mobilen Phase. Das Retentionsvolumen der Substanz X (X = AbrB-Protein) V_R (X) wird als das Volumen der mobilen Phase definiert, das die stationäre Phase ab dem Moment der Probenauftragung bis zum Erscheinen der Substanz X als Peak im Chromatogramm mit einer Flussgeschwindigkeit F [ml/min] passiert hat: V_R (X) = F * t_R (X). Die zugehörige Zeit nennt man dementsprechend die Retentionszeit t_R (X).

Die Säule wurde mit den Standard-Proteinen wie Vitamin B12 (1,35 kDa), Myoglobin (17 kDa), Hühner-Ovalbumin (44 kDa) und α-Globulin (158 kDa) mehrmals geeicht, so dass die molekularen Massen im Bereich von 1,35 bis 158 kDa erfasst werden konnten. Die Retentionsvolumina der Standards und die berechneten Logarithmen der molekularen Massen wurden gegeneinander aufgetragen und daraus eine lineare Regression durchgeführt. Die molekulare Masse der AbrB-Derivate konnte mit Hilfe der Regressionsgleichung aus der Standard-Eichung und aufgrund der Retentionsvolumina der einzelnen AbrB-Proteine bestimmt werden.

5.3.3 Protein-Elektrophorese und Protein-Färbung

5.3.3.1 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die SDS-PAGE erfolgte in der Mini-Protean 3 (Biorad) Elektrophoresezelle mit Tris-Glycin-Puffer (1 x SDS-Laufpuffer, Tabelle 4.18) nach Lämmli-System (Laemmli 1970). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteingemische erfolgte in 10 %- bis 14 %-igen denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen: 10 %-ige Gele für RNAP, 12 %-ige Gele für PhoP und PhoR, 14 %-ige Gele für AbrB und AbbA. Es wurden SDS-Trenngele mit einem 4 %-igem Sammelgel verwendet. Die Proteinproben wurden mit 5 x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95° C denaturiert. Vor dem Auftragen der Proteinproben auf die SDS-Gele wurden diese kurz auf Eis gekühlt und für 1 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (11 bis 170 kDa, Fermentas) wurde aufs Gel mitbeladen. Die Elektrophorese erfolgte bei RT und einer Spannung von 120 V während des Proteinlaufs durch Sammelgel und bei 160 V während des Laufs durch Trenngel. Anschließend wurden die Gele, wie in dem Kapitel 5.3.3.3 beschrieben, gefärbt.

5.3.3.2 Native Proteingele

Für den Nachweis der AbrB-AbbA-Komplexbildung wurden die 2 %-ige native Agarose-Gele in 1 x TG-Laufpuffer (pH 8,8) verwendet. Die Proteine AbrB und AbrBN weisen einen hohen isoelektrischen Punkt (IEP 8,3 bei AbrB BS, IEP 8,9 bei AbrB BA und IEP 9,3 bei AbrBN) auf. Aus diesem Grund blieben die freien Proteine in den Gel-Slots hängen, oder rannten zur Kathode in den nativen Acrylamid- bzw. Agarose-Gelen in den vorherigen Versuchen. Deswegen wurde der Probenkamm in der Mitte des frischgegossenen Agarose-Gels eingesetzt. Die 10 µl des Protein-Ansatzes wurden nativ ohne den Ladepuffer in die Gel-Slots pipettiert. Nach dem Beladen der Proben wurden die Taschen mit 10 µl Agarose vorsichtig versiegelt. Der Lauf erfolgte bei RT für 90 min bei der angelegten Spannung von 70 V. Nach dem Lauf wurden die Agarose-Gele im Fixierer für 10 min gewippt und anschließend 4mal mit VE-Wasser für jeweils 30 min gewaschen. Die Gele wurden auf eine Glasplatte platziert, dann in ein nasses, dünnes Filterpapier eingewickelt und bei 37° C ÜN getrocknet. Die trockenen Agarose-Gele wurden anschließend mit Page Blue Protein Staining Solution (Fermentas) gefärbt und auf dem Molecular Imager FX-Pro Plus (BioRad) sichtbar gemacht. Die für Bindungsassays verwendeten AbbA- und AbrB-Proteine waren mit His-Tag. Der His-Tag wurde in die Berechnung des isoelektrischen Punktes mit dem DS Gene-Programm einbezogen.

5.3.3.3 Protein-Färbung

5.3.3.3.1 Coomassie-Färbung

Die SDS-Gele wurden zuerst für 10 min in einer Entfärberlösung gewaschen, um SDS aus den Gelen zu entfernen. Danach wurden die SDS-Gele für 30 min in einer Coomassie-Lösung auf einer Wippe gefärbt. Nach dem Entfernen der Proteinfärbelösung wurden die Gele erneut in die

Entfärberlösung getaucht, die mehrmals gewechselt wurde, bis die Proteinbanden gut erkennbar und der Gelhintergrund farblos wurden.

5.3.3.3.2 Page Blue Protein Staining Solution

Die trockenen Protein-Agarose-Gele wurden bei RT über Nacht unter leichtem Wippen mit Page Blue Protein Staining Solution (Fermentas) nach dem Herstellerprotokoll gefärbt. Die Fertigfärbelösung war hochsensitiv und machte bereits eine Proteinmenge ab 5 ng in einer Proteinbande sichtbar.

5.3.4 Thrombinverdau zur Entfernung des His-Tags

Zur Entfernung des His₆-Tags von PhoP und AbbA wurde das Thrombin Clean Cleave™ Kit (Sigma-Aldrich) nach Herstellervorgaben verwendet. Das Protein wurde gleich nach der Reinigung, aber noch vor der Dialyse, mit Thrombin über Nacht bei 4° C unter leichtem Wippen verdaut. Der Thrombin-Verdau erfolgte zwischen Argenin und Glycin der LVPR↓GS-Thrombinerkennungssequenz. Nach dem Verdau erfolgte die Dialyse (Kapitel 5.3.1.6) und anschließend das Immunoblot zum Nachweis des entfernten His₆-Tags.

5.3.5 Western Blot

Nach der SDS-Elektrophorese wurde das zu blottende SDS-Gel für 15 min im Blotting-Puffer gewaschen. Das zweite identische SDS-Gel wurde für die Färbung in Coomassie-Lösung vorbereitet. Zwei gelgroße Whatman-Papierstücke und die Nitrozellulose-Membran (Machery Nagel) wurden ebenfalls im Blotting-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde das SDS-Gel auf die Membran zwischen dem Whatman- Papier in Semi-Dry-Blotapparatur (Biorad) für 15 min bei 15 V geblottet. Nach dem Blotten wurde die Membran mit Block-Puffer (5 %-ige Magermilch in 1 x TBST) für 1 h bei RT auf einem Wipper geblockt und nach kurzem Waschen der Membran mit 1 x TBST der His-Tag-Antikörper (Santa Cruz) zu einer Verdünnung von 1:20000 zugegeben. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte ÜN bei 4° C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1 x TBST gewaschen. Die Membran wurde dann in der zweiten Antikörperlösung (Alkalische Phosphatase konjugierter Anti-Kaninchen IgG 1:10000 verdünnt) für 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 1 x TBST wurde die Membran mit 10 ml AP-Puffer äquilibriert und anschließend mit 50 µl Substrat BCIP und 50 µl Redox-Farbstoff NBT entwickelt. Nach dem Erscheinen der dunklen Banden auf der Membran wurde die Reaktion mit 10 x TE-Puffer gestoppt. Die Membran wurde mit dem zweiten, identischen, mit in Coomassie- gefärbten SDS-Gel verglichen. Die AbbA-Proteine mit dem His₆-Tag liefen auf dem 14 %-igen SDS-Gel deutlich höher als die ohne His₆-Tag. Die AbbA BS und PhoP-Proteine mit dem His₆-Tag wiesen auf der Nitrozellulose- Membran dunkle Protein-Banden auf (Anhang: Abbildung 7.11). Der His₆-Tag von PhoP- Protein wurde nach der Thrombin-Behandlung nicht vollständig entfernt. Das His₆-Tag-AbbA-Protein konnte aufgrund der kleinen Molekülmasse nur schwer mit Immunoblot nachgewiesen werden, obwohl die Protein-Konzentration von 5 µg ausreichend war. Zusätzlich wurde zur

Kontrolle das geblottete SDS-Gel mit Coomassie gefärbt, um zu zeigen, dass die Proteinbanden von dem Gel auf die Membran transferiert wurden. Das AbbA- Protein ohne His₆-Tag wurde vollständig übertragen. Das PhoP-Protein konnte aufgrund seiner hohen Molekülmasse bzw. seiner hohen Konzentration nur unvollständig auf die Membran transferiert werden.

5.3.6 Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technik (*Surface Plasmon Resonance –SPR*)

5.3.6.1 Grundlagen der SPR-Technik

Die von der Firma Biacore entwickelte Methode zur Untersuchung spezifischer Interaktionen zwischen den Biomolekülen basiert auf den optischen Biosensoren, die die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (*Surface Plasmon Resonance* - SPR) zur Detektion nutzen (Fagerstam *et al.* 1991). Deren physikalischen Grundlagen wurden bereits 1959 von Turbadar beschrieben (Turbadar 1959).

Das Prinzip der SPR-Messung ist in der Abbildung 5.4 präsentiert. Bei dem Biacore-Sensorchipsystem stellt der von einem ~ 50 nm Goldfilm bedeckte Glasträger das optisch dichtere Medium dar. Das optisch dünnere Medium ist meistens eine Matrix aus carboxymythyliertem Dextran und stellt eine Flusszelle dar. An die Dextranmatrix wird ein Bindungspartner des zu untersuchenden biologischen Systems immobilisiert, während der andere in gelöster Form entlang der Flusszelle darüber geleitet wird (GE-Healthcare 1999, Habauzit *et al.* 2007, Ritzefeld *et al.* 2012).

Die SPR-Sensoren nutzen das quantenmechanische Phänomen, bei dem die freien Elektronen in dünnen Metallfilmen zu Plasmaschwingungen angeregt werden. Dabei entstehen die sogenannten Plasmonen, die sich parallel zur Oberfläche eines Metalls wellenförmig ausbreiten. Durch ein Prisma, das einen hohen Brechungsindex aufweist, wird ein polarisiertes Licht auf die Rückseite des Sensors eingestrahlt und reflektiert. Das Prisma ermöglicht eine verlustarme Lichtumlenkung durch die Totalreflexion, wenn der Lichtstrahl eine Grenzfläche zu einem Medium trifft, das einen niedrigen Brechungsindex (n_2) aufweist (Abbildung 5.4 A). Trifft eine elektromagnetische Lichtwelle auf eine Fläche, in der sie sich nicht ausbreiten kann, so fällt ihre Amplitude (E) hinter der Grenzfläche nicht un stetig auf Null, sondern als ein exponentiell abnehmendes (evaneszentes) Feld, das über ungefähr 300 nm in die benachbarte Flusszelle (optisch dünneres Medium) hineinreicht (GE-Healthcare 1999, Ritzefeld *et al.* 2012).

Eine Kopplung der Oberflächenplasmonen mit den Photonen des polarisierten Lichtes kann stattfinden, wenn deren Komponenten des Wellenvektors parallel zur Oberfläche gleich sind ($k_x = k_{sp}$). Diese Kopplung der beiden Komponenten führt zu einer Verstärkung der Amplitude des evaneszenten Feldes (E) (Ritzefeld *et al.* 2012). Dieses Phänomen, das als *Surface Plasmon Resonance* genannt wird, führt zu einer Reduktion der Intensität des reflektierten Lichtes (Schattenwurf). Der Brechungsindex n_2 kann durch Messung der Intensität des reflektierten Lichtes bei unterschiedlichen Winkeln (θ) detektiert werden (Abbildung 5.4 B). Bei der Interaktion des Analyten mit dem immobilisierten Ligandenmolekül verändert sich der Brechungsindex in der Flusszelle (n_2), resultierend als eine SPR-Winkelveränderung (θ), bei der die Intensitätsreduktion

des reflektierten Lichtes einem Minimum (Schattenwurf) entspricht. Die Verschiebung des SPR-Winkels wird in Echtzeit gemessen, wobei eine Änderung des Brechungsindex um 1×10^{-3} eine Verschiebung des Winkels um $0,1^\circ$ verursacht. In den SPR-Messungen wird das Winkelspektrum als das Signal in RU (*Response Unit*) erfasst (Abbildung 5.4 B) (GE-Healthcare 1999, Habauzit *et al.* 2007, Ritzefeld *et al.* 2012).

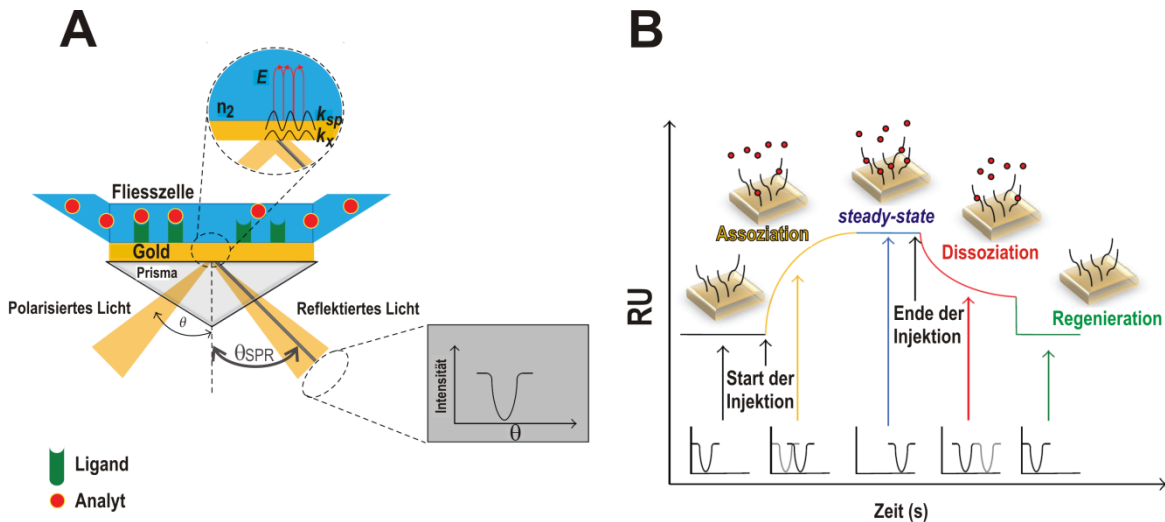


Abbildung 5.4: Prinzip der SPR-Messung.

(A) Schematische Anordnung des optischen Messprinzips. n_2 ist der Brechungsindex des Mediums. Der Brechungsindex ist definiert als das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum zu der im Medium ($n = c/c_m$). E ist die Amplitude des evaneszenten Feldes, k_{sp} steht für einen Wellenvektor des Oberflächenplasmons und k_x für einen Wellenvektor des Photons. Die Biacore-Geräte ermöglichen eine Auflösung der Winkelveränderungen von bis zu 10^{-4} Grad. (B) Ein idealisiertes Sensorgramm einer SPR-Messung, das in vier Phasen eingeteilt ist: Assoziation, *steady-state* (Gleichgewichtsphase), Dissoziation und Regeneration. Die Abbildung ist der Publikation von Ritzefeld *et al.* (2012) entnommen.

5.3.6.2 Präparation von doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden

Die 40 bp große einzelsträngige, komplementäre DNA-Oligonukleotide (Eurofins MWG Operon) wurden von den AbrB-Bindungsstellen 1 (ABS1) und 2 (ABS2) abgeleitet. Die Oligonukleotide überlappten sich um 20 bp. Die komplementären Stränge wurden in *A. bidest* zu einer 100 μ M Stammlösung gelöst und in einem 1:1-Verhältnis miteinander gemischt. Für die Herstellung der ds-DNA-Oligonukleotide wurden die ss-Oligonukleotide dreimal bei 96° C für 5 min denaturiert und diese dann bis zur RT für ca. 1 h heruntergekühlt. Die ds-Oligonukleotide wurden bei -20° C gelagert. Die ds-Oligonukleotide aus dem ABS1 wurden als U1 bis U8 und die aus dem ABS2 als D1 bis D5 bezeichnet und auf die Qualität auf einem 10 %-igen TBE-Acrylamid-Gel überprüft. Zur Kontrolle wurden die ss-Oligonukleotide auf das Gel mitbeladen.

5.3.6.3 Immobilisierung der AbrB-Proteine an den CM5-Sensorchip

5.3.6.3.1 Vorbereitung von AbrB-Sensorchip für die Bindungsstudien mit ds-Oligonukleotiden

Nach dem Einlegen des CM5-Sensorchips wurde die Sensoroberfläche des Chips in engen Kontakt mit der integrierten mikrofluidischen Einheit (*Integrated μ -Fluidic Cartridge*; IFC) gebracht, die eine kontrollierte Führung der Probe über die Flusszellen ermöglichte. Zunächst wurde der CM5-Sensorchip dreimal durch die fortlaufenden Injektionen mit 10 mM NaCl, 50 mM NaOH und 0,1 % (w/v) SDS für 10 s mit einer Flussrate von 100 μ l/min konditioniert. Anschließend wurde der CM5-Chip dreimal mit dem Laufpuffer 1 (10 mM NaAcetat von pH 5, 150 mM NaCl) beschichtet, um die restlichen Kondensierungsreagenzien zu beseitigen. Zur kovalenten Kopplung der Liganden (*full-length* AbrB, AbrBN, Lysozym) an den Dextran-basierten CM5-Sensorchip wurden Aminogruppen des Liganden genutzt. Die Messzelle wurde mittels *single flow path*-Funktion mit 120 μ l eines 1:1-Gemisches von EDC (0,4 M) und NHS (0,1 M) aktiviert. Die Carboxylgruppen der Dextran-Matrix (Carboxymethylierter Polymer) wurden dabei in reaktive Estergruppen überführt. N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) ist ein Aktivierungsreagenz und reagiert zuerst mit der Carboxylgruppe zu einem O-Acylisoharnstoff, der anschließend mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) in reaktive Succinimid-Ester überführt wird. Die Proteine wurden in 10 mM NaAcetat-Puffer (pH 5) zu einer Endkonzentration von 10 ng/ μ l (0,7 μ M AbrB, 1,2 μ M AbrB-N und 0,65 μ M Lysozym) verdünnt und 30 μ l des jeweiligen Liganden auf den aktivierten Chip mit einer Flussrate von 10 μ l/min gekoppelt. Dabei reagieren die freien NH₂-Gruppen von den Liganden mit den Ester-Gruppen auf dem Chip zu Amiden. Die Sensoroberfläche wurde durch die Injektion mit dem überschüssigen Ethanolamin deaktiviert, so dass alle freien Estergruppen besetzt waren und keine Probenmoleküle mehr aufgrund der Kopplungsreaktionen banden. Die Immobilisierung der Kontrolloberfläche (Fc1) wurde analog zur Flusszelle durchgeführt, der Liganden-Kopplungsschritt wurde jedoch mit dem Acetatpuffer ohne Ligandenzusatz durchgeführt. Die Äquilibration der Basislinie wurde durch einen kontinuierlichen Fluss (50 μ l/min) vom Laufpuffer durch den Chip für 1 h ausgeführt. An die Flusszelle 4 (Fc4) wurden 8679 Bindungseinheiten (*Response Units*- RU) von *full-length* AbrB, an Fc3 6638 RU vom AbrBN und an Fc2 3289 RU von Lysozym beladen. Eine Signalzunahme von 1000 RU, d.h. eine Verschiebung des Ausstrahlwinkels von 0,1°, entsprach einer Anlagerung von 1 ng/mm² Ligand (Ritzefeld *et al.* 2012). Unter Berücksichtigung der molekularen Masse und der polymeren Form der Proteine ergaben diese RU eine molekulare Beladung von 0,16 pmol/mm² von AbrB-Tetramer, 0,39 pmol/mm² von AbrBN-Dimer und 0,23 pmol/mm² von Lysozym.

5.3.6.3.2 Vorbereitung von AbrB-Sensorchip für die Bindungsstudien mit AbbA

Die Beladung von dem CM5-Sensorchip mit den AbrB-Proteinen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie oben beschrieben. Vor der Aktivierung der Sensoroberfläche wurde die IFC (integrierte mikrofluidische Einheit) und die Flusszellen mit dem Laufpuffer 2 (50 mM HEPES, pH 7,4, 300 mM NaCl, 10 mM DTT) gespült. Die AbrB-Proteine wurden im SPR-Puffer 2 (50 mM HEPES von pH 7,4, 300 mM NaCl, 10 mM DTT, 10 % Glycerin) zu einer Endkonzentration von 100 nM verdünnt und anschließend 10 μ l von AbrB auf den aktivierten Chip mit einer Flussrate von 5 μ l/min beladen. An die Flusszelle 4 (Fc4) wurden 470 RU von *full-length* AbrB BA (9,29 fmol/mm², AbrB-Tetramer), an

die Flusszelle 3 (Fc3) 484 RU von *full-length* AbrB BS (9,57 fmol/mm², AbrB-Tetramer) und an die Flusszelle Fc2 143,6 RU von AbrBN (8,49 fmol/mm², AbrBN-Dimer) beladen.

5.3.6.4 SPR-Messungen: AbrB-Bindungsassays

5.3.6.4.1 Bindungsstudien zwischen dem AbrB-Protein und den ds-DNA-Oligonukleotiden

Die Bindungsanalysen wurden mit dem optischen Biacore-Biosensorgerät 3000 (Biacore, GE Healthcare) durchgeführt. Für die Untersuchung der Bindung von einem Analyt an einen Liganden wurde die *multi chanel flow path*-Funktion verwendet, bei der zuerst die Referenzzelle (Fc1) und dann die spezifische Oberfläche der Flusszellen durchgespült wurde. Alle Biacore-Messungen erfolgten bei 25°C und einer konstanten Flussrate von 50 µl/min. Der Laufpuffer wurde davor durch eine 0,2 µm Membranfilter (Schleicher & Schüll) filtriert und mittels Sonifizierung für 10 min entgast.

Vor der Datenermittlung wurden unterschiedliche Pufferbedingungen in Bezug auf die Stabilisierung einer Basislinie (*base line*), so wie die Regenerierung der Sensoroberfläche nach Liganden-Bindung, getestet. Die Bindungsstudien mit ds-DNA-Oligonukleotiden erfolgten in 10 mM NaAcetat (pH 5,5) und 150 mM NaCl (Laufpuffer 1). Unter den genannten Pufferbedingungen zeigten die AbrB-Proteine keine signifikante Dissoziation und die Basislinie war stabil. Nach jeder Messung wurde die Sensoroberfläche durch die Injektion von 10 µl 500 mM NaCl und 0,1 % Tween20 im Laufpuffer 1 regeneriert. Dabei wurden die gebundenen Oligonukleotiden effizient entfernt und die Bindungskapazität der Sensorchip-Oberfläche (Anhang, Abbildung 7.12 D) wurde wiederhergestellt. Die AbrB-Oberfläche blieb für mindestens hundert Bindungs- und Regenerierungszyklen stabil. Die Flusszellen wurden nach jeweils hundert Einzelexperimenten durch Injektion von 30 µl einer 0,5 µM Proteinlösung bei einer Flussrate von 10 µl/min rekonstituiert, um die Polymerformen zu regenerieren (Anhang, Abbildung 7.12 C). Anschließend wurde der Chip mit dem Laufpuffer 1 gewaschen. Vor der Fortsetzung weiterer Messungen erfolgte zuerst eine Kontrolle der Signalqualität. Dafür wurden Kontrollmessungen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen des U3-Oligonukleotides, das hohe Signale lieferte, durchgeführt.

Zur Bestimmung der kinetischen Bindungs-Parameter wurden Bindungssignale der verschiedenen Analytkonzentrationen (5-100 nM) über die Zeit aufgenommen (Anhang, Abbildung 7.12 D). Die ds-Oligonukleotide wurden im SPR-Puffer 1 (Tabelle 4.18) verdünnt. Es wurden jeweils Proben mit einem Volumen von 100 µl angesetzt. Das benötigte Volumen pro Messung betrug 50 µl. Das Signal der Referenzzelle (Fc1) wurde von dem Signal der Flusszelle (Fc2/ Fc3/ Fc4) abgezogen, so dass das spezifische Bindungssignal (z.B. Fc2-1) erhalten werden konnte und dann, den weiteren Auswertungen diene.

Eine Referenzoberfläche ermöglichte die Qualität der Bindungsdaten erheblich zu steigern. Die Artefakte, die von dem Brechungsindex des Laufpuffers, den Matrix-Effekten, den nichtspezifischen

Bindungen sowie den Injektionsschwankungen und dem Basisliniendrift herrührten, konnten dadurch korrigiert werden (GE-Healthcare 1999).

5.3.6.4.2 Bindungsstudien zwischen den AbrB- und AbbA-Proteinen

Die Bindungsexperimente von AbbA BS und BA mit den Chip-gekoppelten AbrB-Proteinen erfolgten nach dem gleichen Prinzip wie oben beschrieben. Die Bindungssignale wurden bei verschiedenen AbbA-Konzentrationen (0,05 bis 5 µM) bei einer konstanten Flussrate von 60 µl/min aufgenommen. Die AbbA-Proteine wurden in SPR-Puffer 2 (50 mM HEPES von pH 7,4, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 % Glycerin) verdünnt. Die AbbA-Proben wurden jeweils mit einem Volumen von 120 µl in 7 mm-Plastiktubes (Plastic Vials, GE Healthcare Bio-Sciences AB) angesetzt, von dem 60 µl für die Messung injiziert wurden. Jede Probe wurde dreimal neu angesetzt und vermessen.

5.3.6.5 Datenauswertung mit der BIAevaluation-Software

Ein typischer Verlauf eines Sensorgramms aus einer Biacore-Messung, aufgetragen als Bindungseinheiten (*Response Units* - RU) über die Zeit, besteht aus einer Assoziationsphase, dem Gleichgewichtsbereich (beobachteten RU im Gleichgewicht – *steady-state*), sowie der Dissoziationsphase. Die mit dem BIAcontrol aufgenommenen Kurven wurden in das BIAevaluation 3.1 Programm importiert. Zur Berechnung der Parameter wurden sowohl ein Injektionsstart und –stopp, als auch die Bereiche der Assoziation und Dissoziation, über die eine Berechnung erfolgen sollte, manuell festgelegt. Den einzelnen Kurven wurde deren Analytenkonzentration zugeordnet, das Bindungsmodell ausgewählt und die Berechnung initiiert. Die Berechnung konnte sowohl global (mehrere Kurven simultan – *global fit*), als auch lokal (jede Kurve separat – *local fit*) für verschiedene Parameter erfolgen. Das BIAevaluation Software Handbuch (Version 3.1) beschreibt ausführlich die einzelnen Bindungsmodelle und die dazu angewendeten Gleichungen.

Leider war es nicht möglich, die Assoziation- und Dissoziationphasen der Kurven simultan (*global fit*) auszuwerten. Demzufolge wurden stattdessen die thermodynamischen Parameter ausgewertet: *Response Units* (RU) im *steady-state* –Bereich der Assoziationsphase wurden gegen die Analytenkonzentrationen aufgetragen (*plot*) und die daraus resultierenden Kurven mit Hilfe der *general fitting* -Modelle unter Nutzung der Gleichung von *steady-state affinity* (2) und *4-parameter-equation* (3) ausgewertet.

$$\frac{1}{R_{eq}} = \frac{n}{RU_{max}} + \frac{K_D}{RU_{max}[Analyt]} \quad (2)$$

$$R_{eq} = \frac{R_{hi} - (R_{hi} - R_{lo})}{1 + ([Analyt]A_1^{-1})^{A_2}} \quad (3)$$

R_{eq} steht für ein SPR-Signal, entsprechend der Einstellung eines Gleichgewichts zur gegebenen Analytenkonzentration [z. B. ds-DNA-Oligonukleotid], RU_{max} einer Reaktion tritt bei unendlich hohen Analytenkonzentrationen auf, wenn der Ligand (AbrB) vollständig mit Analyt gesättigt ist, d.h. wenn Ligand vollständig in der Ligand-Analyt-Form vorliegt. R_{hi} ist übereinstimmend mit RU_{max} , R_{lo} steht für den Schnittpunkt mit der Ordinate. K_D ist die thermodynamische

Gleichgewichtskonstante der Dissoziation und entspricht dem Wert $RU_{\max}/2$. A_1 und A_2 sind zwei *fit*-Konstanten, obwohl A_1 der Dissoziationskonstante K_D entspricht. Bei Gleichung (2) ist n ein sterischer Störfaktor (BiacoreAB (1999), BIAevaluation Kapitel 6.2) und wurde in der Berechnung als $n = 1$ gesetzt.

Die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation konnte auch aus dem Hill-Plot (4) abgeleitet werden.

$$\log\left(\frac{R_{eq}}{RU_{\max}-R_{eq}}\right) = n_H \log[\text{Analyt}] - \log K_{app} \quad (4)$$

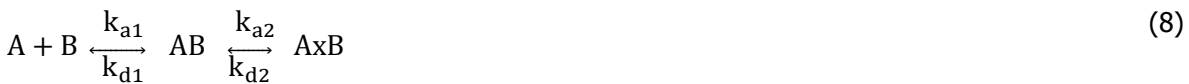
RU_{\max} wurde aus den beiden *fitting*-Modellen (Gleichung (2) und (3)) abgeleitet und n_H ist der Hill-Koeffizient, der die Kooperativität beschreibt (Voet *et al.* 2002). Die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation K_D stellt einen K_{50} -Wert dar, welcher die Analytenkonzentration angibt, bei der die Hälfte aller Bindungsstellen des Liganden (AbrB-Protein) durch den Analyten (Oligonukleotide oder AbbA) besetzt sind. Bei der linearen Auftragung von $\log[R_{eq}/(RU_{\max}-R_{eq})]$ gegen $\log[\text{Analyt}]$, der sogenannten Hill-Auftragung, ist der Hill-Koeffizient n_H die Steigung und K_D der Abszissenabschnitt. Von wichtiger Bedeutung war die Ermittlung der kinetischen Parameter aus den SPR-Daten unter der Nutzung der unterschiedlichen Bindungsmodelle. Dabei war das simultane Anpassen der Assoziations- und Dissoziationsphase (*global fit*) nicht zufriedenstellend. Jedoch konnte man die Anpassungen für jede Kurve unter Verwendung von *Two-State-Reaction*-Modell separat (*local fit*) durchführen, welches folgende Gleichungen in Parameterberechnung einbezog:

$$\frac{dB}{dt} = -k_{a1}[A][B] - k_{d1}[AB] \quad (5)$$

$$\frac{dAB}{dt} = (k_{a1}[A][B] - k_{d1}[AB] - (k_{a2}[AB] - k_{d2}[A_xB])) \quad (6)$$

$$\frac{dA_xB}{dt} = k_{a2}[AB] - k_{d2}[A_xB] \quad (7)$$

A steht für die molare Konzentration des Analyten (Oligonukleotide bzw. AbbA-Proteine), B ist der Ligand (AbrB), AB und A_xB sind die Analyt-Ligand-Komplexe. Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_a und Dissoziation k_d sind in dem *Two-State-Reaction*-Modell (8) wie folgt definiert:



Die *apparent* Affinitätskonstante K_A mit Einheit $[1/M]$ wurde aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten abgeleitet:

$$K_{apparent} = \left(\frac{k_{a1}}{k_{d1}}\right) * \left(\frac{k_{a2}}{k_{d2}}\right) \quad (9)$$

Die Dissoziationskonstante K_D konnte aus K_A abgeleitet werden: $K_D [M] = 1/K_A$. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{a1} und k_{d1} stehen für Kinetik der Bindungsreaktionen, während die Raten k_{a2} und k_{d2} die konformationelle Änderung präsentieren, wobei k_{a2} mit Einheit $[s^{-1}]$ im Gegensatz zu k_{a1} mit Einheit $[M^{-1} s^{-1}]$ unabhängig von der Molarität ist.

Für die Berechnung der kinetischen Parameter aus den AbbA-AbrB-Bindungskurven wurden zusätzlich die Gleichungen aus den Modellen wie 1:1-Lagmuir und *Bivalent-Analyte* genutzt. Die verwendete Gleichung aus dem 1:1-Lagmuir-Modell ist mit der dargestellten Gleichung (2)

identisch, wobei $n = 1$ ist. Die Gleichgewichtsreaktionen sind in dem *Bivalent-Analyte*-Modell in zwei Schritten folgend definiert:



Die Assoziationsrate k_{a2} hat die Einheit $[RU^{-1}s^{-1}]$, weil die zweite Reaktion den AB-Komplex (in RU) bei der Bindung an den (zweiten) B-Liganden einbezieht.

Die Auswertung unter Anwendung von *Bivalent-Analyte*-Modell erfolgte für jede Kurve separat (*local fit*) unter Einbezug folgender Gleichungen:

$$\frac{dB}{dt} = -(k_{a1}[A][B] - k_{d1}[AB]) - (k_{a2}[AB][B] - k_{d2}[AB_2]) \quad (11)$$

$$\frac{dAB}{dt} = (k_{a1}[A][B] - k_{d1}[AB]) - (k_{a2}[AB][B] - k_{d2}[AB_2]) \quad (12)$$

$$\frac{dAB_2}{dt} = (k_{a2}[AB][B] - k_{d2}[AB_2]) \quad (13)$$

Beim *local fit* wurde neben den kinetischen Parametern auch das sog. Fehlerquadrat χ^2 (Chi-Quadrat) bestimmt. Dieser Wert diente als Qualitätsmerkmal der errechneten Parameter und sollte 1 % des maximalen RU-Wertes nicht überschreiten.

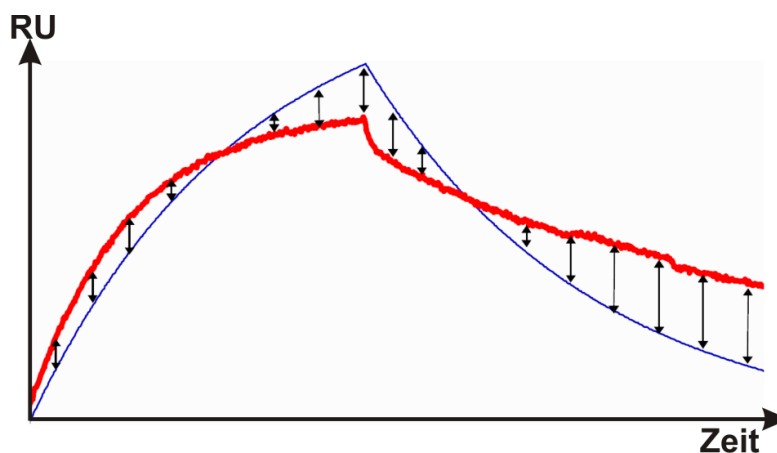


Abbildung 5.5: Differenz zwischen der berechneten (blau) und der experimentell (rot) ermittelten Bindungskurve.

Der schraffierte Bereich entspricht der graphischen Darstellung des χ^2 -Wertes, dem Flächenquadrat der Abweichung der Messwerte vom berechneten „idealen“ *fit*.

5.3.7 Spektroskopische Untersuchungen

5.3.7.1 Tyrosin-Fluoreszenz-Emission

Die Tyrosin-Fluoreszenz-Emission-Messungen erfolgten in der 10 mm F115-QS-Präzisionsküvette (Hellma) bei 25° C mit Hilfe des FluoroMax-4 Spektrophotometers von Jobin Yvon. Die Fluoreszenz wurde bei 276 nm angeregt und es wurden die Emissionsspektren von 295 nm bis 365 nm detektiert. Das AbrB-Protein besitzt zwei Tyrosinreste (Y37 und Y48), die innerhalb der N-terminalen Domäne liegen. Sowohl das Wildtyp-AbrB, als auch AbrB-Mutanten wurden auf die

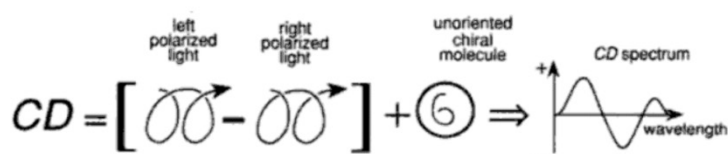
gleiche Konzentration von 50 μM in HEPES_{Fluoreszenz}-Puffer (Tabelle 4.18) verdünnt und jeweils in 2 μM Konzentrationen für die Fluoreszenz-Spektren eingesetzt.

5.3.7.2 Zirkulardichroismus (CD)

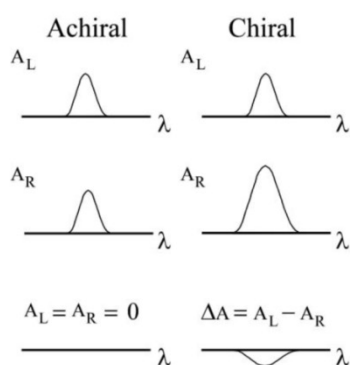
5.3.7.2.1 Grundlagen von Zirkulardichroismus

Zirkulardichroismus ist definiert als die Differenz zwischen der Absorption von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht beim Passieren der chiralen Molekülen, wodurch elliptisch polarisiertes Licht entsteht (Abbildung 5.6 A). Die Chiralität der Proteine wird durch die zentralen α -Atome mit vier nicht-identischen Gruppen verliehen. Bei CD wird die molare Absorptionsdifferenz ΔA bzw. $\Delta \epsilon$ mit der Einheit $[\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}]$ gemessen, oder als molare Elliptizität θ (eine alte Einheitbezeichnung), welche in Winkelgraden [mdeg] angegeben wird. Die Absorption des links- (A_L) und rechts- (A_R)-zirkular polarisierten Lichtes durch achirale Moleküle zu allen Wellenlängen ist gleich Null ($\Delta A=0$, da $A_L=A_R$), deshalb ergibt sich dabei kein CD-Signal (Abbildung 5.6 B). Im Fall der chiralen Moleküle wird eine Differenz ermittelt, die ein positives oder ein negatives CD-Signal ergibt. Das Vorzeichen des Signals ist abhängig von den relativen Intensitäten der links- und rechtsvorgegebenen Absorptionen. Positive CD-Signale entstehen, wenn die linkszirkular polarisierte Komponente stärker absorbiert wird. Negative CD-Signale entstehen, wenn das rechtszirkular polarisierte Licht stärker absorbiert wird. Die Differenz ΔA ist sehr gering und beträgt gewöhnlich nur 0,1 % von der Gesamtaborption oder ist geringer. (C) Die Kombination aus links- (E_L) und rechts- (E_R) zirkular polarisierten Lichtstrahlen mit einer gleichen Amplitude und Phase ergibt ein linear polarisiertes Licht (achirale Moleküle). Das elliptisch polarisierte Licht entsteht aus der Superposition (Überlagerung) von zwei zirkular polarisierten Wellen von verschiedenen Amplituden (chirale Moleküle).

A



B



C

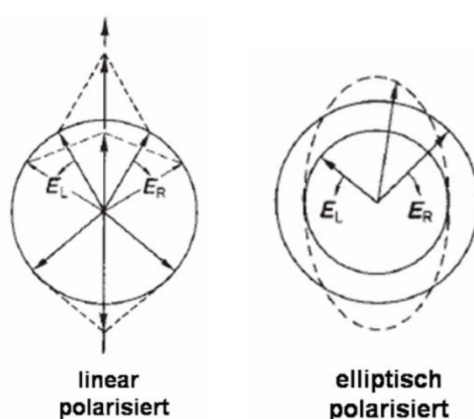


Abbildung 5.6: Messprinzip der Zirkulardichroismus-Spektroskopie.

Die Abbildungen und der theoretische Ansatz entstammen der Publikation von Wallace *et al.* (2009).

Im Nah-UV-Bereich von 360 nm bis 260 nm werden Informationen über die Tertiärstruktur gewonnen, denn hier absorbieren die aromatischen AS und in geringem Maße auch Disulfidbrücken (Abbildung 5.7 A). Die Abbildung 5.7 B zeigt die Absorptionsmaxima (nm) der aromatischen Aminosäuren mit dazu gehörigen molaren Extinktionskoeffizienten. Im Fern-UV-Bereich von 260 nm bis 190 nm werden die Bindungselektronen der Peptidbindungen angeregt (Abbildung 5.7 A).

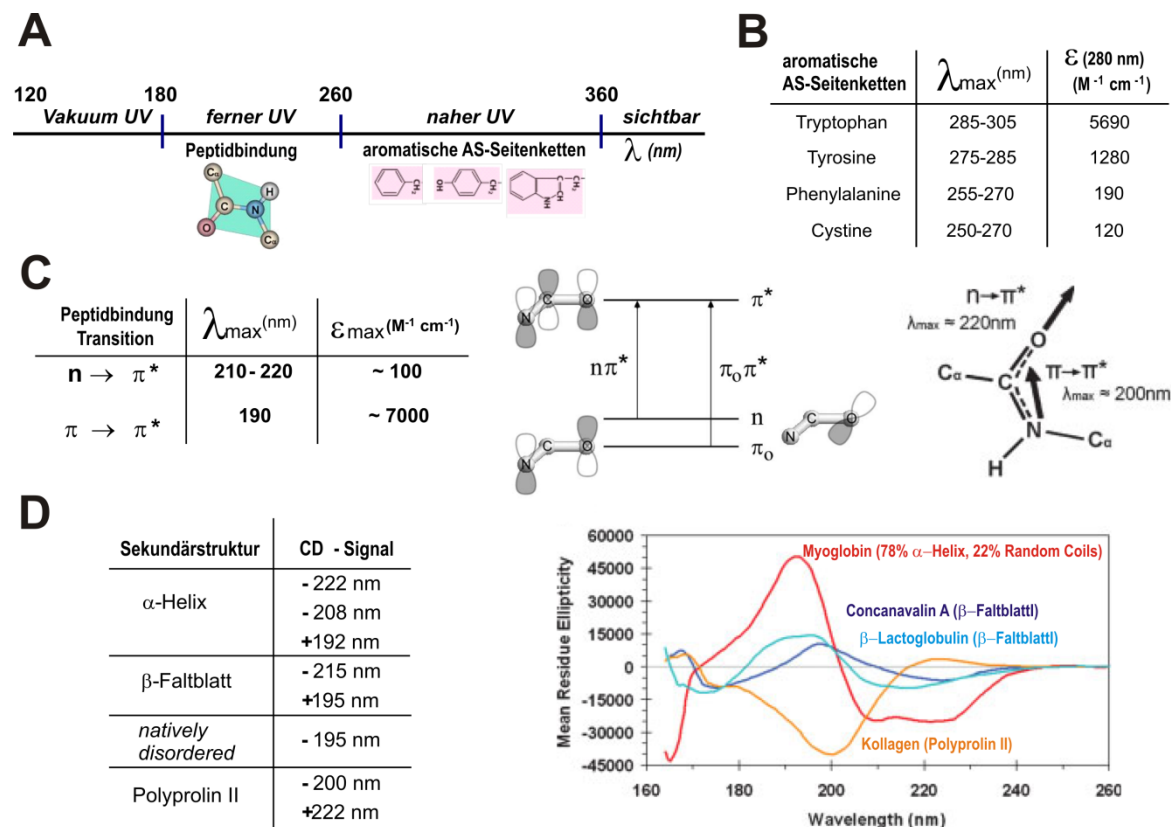


Abbildung 5.7: Grundlagen zur Auswertung der CD-Spektren.

Die Abbildungen und der theoretische Ansatz entstammen der Publikation von Whitmore *et al.* (2008), sowie dem Buch von Wallace *et al.* (2009).

Um das CD-Signal einer chiralen Probe messen zu können, ist es notwendig, dass sich ein Chromophor in der Nähe des Chiralitätszentrums befindet, was bei Proteinen durch die Peptidbindung des Proteinerückgrats gegeben ist (Abbildung 5.7 C). Ein CD-Signal wird gemessen, wenn die Bindungselektronen der Peptidbindungen angeregt werden, so dass es zu $n \rightarrow \pi^*$ bzw. $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergängen kommt. Die Orbitalen zeigen sowohl ein nicht-bindendes (π) Molekülorbital des Peptidchromophors als auch ein anti-bindendes (π^*) Molekülorbital, sowie das ungepaarte Elektronenpaar des Sauerstoffs (n) der Carbonylgruppe. Die für die berechneten CD-Basispektren der reinen Proteinsekundärstrukturen typische Maximas und Minimas im nm-Bereich (Abbildung 5.7 D links). Die CD-Spektren der bekannten Proteine zeigen ein α -Helix-reiches Myoglobin, zwei β -Faltblatt-reiche Proteine und Kollagen mit einer supersekundären Struktur Polyprolin II-Helices. Die

beiden β -Faltblatt-reichen Proteine haben beinahe identischen Anteil an β -Faltblatt, jedoch unterschiedliche Faltung. Die β -Faltblatt-Strukturen tendieren mehr zu Variabilität, dies wird durch ihre CD-Spektren verdeutlicht. Außerdem tendieren die Spektren von β -Faltblatt zur niedrigeren Signal-Elliptizität im Vergleich zu den α -Helix-Spektren.

5.3.7.2.2 CD-Messungen

Die CD-Spektroskopie erfolgte an dem Jasco J-720 Spectropolarimeter im Wellenlängenbereich von 260 bis 185 nm bei einer konstanten Temperatur von 25° C. DNA und Proteine waren im speziellen CD-Puffer (10 mM TrisHCl von pH 7,4, 300 mM NaF, 1 mM bzw. 10 mM DTT, 10 % Glycerin) verdünnt. Die über FPLC-gereinigte Proteine wurden nicht eingefroren, sondern gleich für die Messungen eingesetzt. Das Pufferspektrum wurde als Referenz-Spektrum von den CD-Spektren der Proteine und denen der DNA immer abgezogen. Um die Störeffekte in den Testbedingungen oder der Geräteausrüstung zu vermeiden, wurden jeden Tag die CD-Spektren vom Puffer und Protein aufgenommen.

Für die Analyse der Auswirkung von AbbA auf die DNA-AbrB-Interaktion wurden die Bindungsassays von AbrB BS (20 μ M) entweder als Komplex mit dem D4-Oligonukleotid (5 μ M) der AbrB-Bindungsstelle 2, oder mit seinem Antirepressor AbbA BS (40 μ M), in einem 150 μ l Probevolumen, in einer 1 mm-Präzisionsküvette aus Quarzglas (Hellma) durchgeführt. Um die Veränderungen im AbrB-Protein zu visualisieren, wurde das Spektrum des D4-Oligonukleotids von den Komplexspektren subtrahiert. Zehn Scanspektren wurden von jeder Probe (Puffer, DNA, Protein, Komplex) akkumuliert und gemittelt. Der Spektrumverlauf erfolgte in [mdeg] und wurde in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta]_{MRE}$ mit Einheit $[\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{Rest}^{-1}]$, gemäß der Gleichung umgerechnet,

$$[\Theta]_{MRE} = \frac{\theta \times M}{10 \times C \times d \times N_A}$$

wobei N_A die Anzahl der Aminosäuren, d Schichtdicke der Küvette [cm], c die Konzentration [g/L] und M die molekulare Masse [g/mol] darstellte. Die Bindungsstudien von AbrB bzw. AbrBN mit den einzelnen 40 bp großen ds-DNA-Oligonukleotiden erfolgten bei Konzentrationen von 20 μ M (Protein) und 2,5 μ M (DNA). Das CD-Spektrum wurde im Bereich zwischen 200 und 320 nm der Wellenlänge aufgenommen.

Zum Ableiten der Sekundärstrukturen von AbrB und AbbA aus den CD- Daten wurde eine 0,1 mm-Quarzglas-Küvette (Starna) mit 25 μ l-Volumenprobe verwendet. Zwanzig Scanspektren von jeder Proteinprobe wurden akkumuliert und gemittelt. Jede Messung erfolgte ungefähr 90 min bei konstanten 25° C. Die Messung von jedem Protein wurde dreimal wiederholt und jedes einzelne CD-Spektrum separat mit dem *online*-Server DichroWeb (Whitmore *et al.* 2004) ausgewertet. Die Auswertung wurde ausführlich in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Das Hochladen der CD-Spektren (*input*) erfolgte in der Einheit [mdeg] und der graphische Datenausgang (*output*) in mittlerer molarer Elliptizität $[\Theta]$ mit der Einheit $[\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1} \text{Rest}^{-1}]$. Das Messprinzip zur Zirkulardichroismus-Spektroskopie wurde ausführlich in Abbildung 5.6 und Abbildung 5.7 dargestellt.

5.3.8 Kleinwinkelröntgenstreuung (*Small Angle X-Ray Scattering - SAXS*)

5.3.8.1 Deutsches Elektronen-Synchrotron - DESY

Das DESY ist eines der weltweit führenden Beschleunigerzentren und gehört zur Helmholtz-Gemeinschaft. Bei DESY sind zwei Synchrotrone für Elektronen und Positronen vorhanden: PETRA III und DORIS III. Das Synchrotron ist ein Ringbeschleuniger, in dem geladene Elementarteilchen (z.B. Elektronen, Photonen) auf sehr hohe Geschwindigkeit beschleunigt werden, wodurch sie sehr hohe kinetische Energien erhalten. PETRA III ist 2304 m lang und umschließt das DESY-Gelände. Seit 2009 ist PETRA III weltweit eine Speicherring-Röntgenstrahlungsquelle und erzeugt Röntgenstrahlung (elektromagnetische Wellen mit Photonenenergien) der Wellenlänge im Bereich zwischen $0,6 \text{ \AA}$ ($0,06 \text{ nm}$) und 3 \AA ($0,3 \text{ nm}$). DORIS III ist ein 289 m langer Ringbeschleuniger und war von 1993 bis 2012 die Quelle für Synchrotronstrahlung.



Abbildung 5.8: DESY-Gelände im Überblick.

PETRA III – ein 2304 Meter langer Ringbeschleuniger, DORIS III – ein 289 Meter langer Ringbeschleuniger, FLASH – der Freie-Elektronen-Laser im Vakuum-Ultraviolett- und im weichen Röntgenbereich bis zu einer Wellenlänge von $\sim 4 \text{ nm}$ (www.desy.de).

5.3.8.2 Grundlagen des Streuprozesses

Eine Protein- bzw. Pufferprobe wird mit einem monochromatischen Röntgenstrahl durchstrahlt. Die einfallenden Röntgenstrahlen werden dabei an den Partikeln in alle Richtungen gestreut und erzeugen an einem zweidimensional auflösenden Detektor ein Streumuster. Die gestreute Intensität (I) ist lediglich eine Funktion des Streuwinkels (2θ) (Abbildung 5.9 A).

Die Wellenlänge (λ) der Röntgenstrahlung in einem SAXS-Experiment ist so gewählt, dass die gestreute Intensität durch elastische Streuprozesse hervorgerufen wird. Das Standardschema eines elastischen Streuprozesses für ein im Vakuum befindliches Partikel ist in der Abbildung 5.9 A gezeigt. Die Vektoren der einfallenden k_0 und der gestreuten Welle k_1 sind bei der elastischen Streuung betragsgleich und definiert als: $k_1 = k_0 = 2\pi/\lambda$. Zu der unter einem Streuwinkel gestreuten Intensität gehört ein Wellenvektor k_1 und der Wellenvektorübertrag ist definiert als $s =$

$k_1 - k_0$ und für dessen Betrag im elastischen Streuprozess gilt: $s = 4\pi \sin \theta / \lambda$ (Svergun *et al.* 2001, Mertens *et al.* 2010). Die über eine Kleinwinkelröntgenstreuung zugänglichen Längenskalen – die Auflösung eines SAXS-Experiments – liegen in der Größenordnung zwischen 10 und 1000 Å (1 Å = 0,1 nm).

5.3.8.3 Streuung an Proteinen

Die in einer Flüssigkeit gelösten Teilchen besitzen keine Vorzugsorientierung, vielmehr sind sie gleichmäßig in alle Raumrichtungen orientiert. Es handelt sich um isotrope Systeme, d.h. die Verteilung der an einer solchen, flüssigen Probe gestreuten Intensität ist richtungsunabhängig und die Streubilder bleiben bei einer Änderung der Orientierung des Partikels konstant.

Die Kleinwinkelstreuung an Proteinen liefert eine Aussage über die vorliegende Gestalt der Proteine. Das Vorhandensein einer Hydrathülle am Protein liefert einen weiteren Streubeitrag $A_b(s)$. Für die Datenanalyse bedeutet die vorhandene Hydrathülle, dass das Protein größer erscheint. Für die Streuintensität der gesamten Proteinprobe, die aus den identischen Partikeln besteht, auch Formfaktor genannt, wird nach folgender Formel berechnet (Feigin *et al.* 1987, Svergun *et al.* 2001):

$$P(s) = \langle |A_a(s) - p_s A_s(s) + \delta p_b A_b(s)|^2 \rangle_{\Omega}$$

$A_a(s)$ steht für Streuungsamplitude des Proteins, $A_s(s)$ und $A_b(s)$ bezeichnen die Streuung an dem Puffer bzw. an der Hydrathülle mit der Einheitsdichte p . p_s ist die Elektronendichte des Lösungsmittels und $\delta p_b = p_b - p_s$ die Differenz zwischen Hydrathülle und Umgebung. Die Raummittelung erfolgt über den vollen Raumwinkel, deswegen steht $[]_{\Omega}$, weil bei ausreichend verdünnten Proteinproben die Streuamplitude des gesamten Probensystems (Proteinlösung) proportional zu der Streuamplitude eines einzelnen, über alle möglichen Orientierungen gemittelten Partikels ist (Svergun *et al.* 2001). Der Formfaktor wird mit dem GNOM-Programm berechnet (Svergun 1992).

5.3.8.4 Aufreinigung der Proteine für SAXS-Messungen

Die SAXS-Methode setzte eine saubere, monodisperse, hochkonzentrierte (Proteinkonzentration im Milligramm-Bereich) Proteinprobe voraus. Die Proteine wurden überexprimiert (Kapitel 5.1.2.1) und über mehrere Schritte, wie in Kapiteln 5.3.1 beschrieben, gereinigt. Nach der präparativen Gelfiltration mittels FPLC (Kapitel 5.3.1.4; FPLC-Chromatogramm Abbildung 7.9) wurden die Proteinfractionen auf die Qualität mittels SDS-PAGE (5.3.3.1; SDS-Gele Abbildung 7.10) überprüft. Die saubersten Proteinfractionen wurden zusammengemischt und dialysiert. AbrB wurde in einem Puffer aus 50 mM TrisHCl (pH 7,4), 150 mM NaCl und 2 mM β -Mercaptoethanol und AbbA in einem Puffer aus 50 mM TrisHCl (pH 7,4), 150 mM NaCl und 1 mM DTT dialysiert. Die AbbA- und AbrB-Proteine wurden anschließend über die VivaSpins (15 kDa für AbbA bzw. 30 kDa für AbrB) von Sartorius nach dem Herstellerprotokoll ankonzentriert. Die optimalen Konzentrationen für SAXS-Messung wurden erreicht und betrugen für jedes Protein 2,5 mg/ml und 5 mg/ml. Der

Dialysepuffer von jedem Protein wurde für die SAXS-Messungen als Referenz genommen. Die Proteinproben wurden im Kühlraum (4° C) gelagert und waren 4-6 Tage lang stabil.

5.3.8.5 SAXS-Messungen an der X33-Strahllinie (DORIS III, Hamburg)

Die SAXS-Messungen von AbrB und AbbA erfolgten an der X33-BioSAXS-Strahllinie (*beamline*). X33 nutzte die von DORIS III erzeugte Röntgenstrahlung einer Wellenlänge von 0,15 nm (Roessle *et al.* 2007). Für SAXS-Experimente war eine monochromatische Röntgenstrahlung notwendig. Deswegen traf die polychromatische Synchrotronstrahlung zuerst auf einen Monochromator, der die notwendige Wellenlänge herausfilterte. Die X33-Strahllinie nutzte den Si 111 Monochromator einer festen Wellenlänge λ von 0,15 nm. Bei den SAXS-Messungen am X33-Instrument wurde elastische Streuung von Röntgenstrahlen unter sehr kleinen Streuwinkeln ($2\theta = 0,1$ bis 10°) aufgezeichnet und zu einem Wellenvektorübertrag s [nm^{-1}] umgerechnet ($s = k_1 - k_0$, $s = 4\pi \sin \theta / \lambda$; wobei $\lambda = 1,5 \text{ \AA} = 0,15 \text{ nm}$). In einem Probe-Detektor-Abstand von 2,7 m nahm der zweidimensional auflösende Detektor die Streuungsintensitäten I über den breiten Bereich des Streuungs-Vektors s [nm^{-1}] von $s = 0,08 \text{ nm}^{-1}$ bis $\sim 5 \text{ nm}^{-1}$ auf (Abbildung 5.9 B). Jede Messung dauerte 2 min bei 8° C und erforderte das Probenvolumen von 60 μl . Die Proteinproben wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (jeweils 2,5 mg/ml und 5 mg/ml) vermessen. Der zu jedem Protein entsprechende Dialysepuffer wurde unter denselben Bedingungen vermessen.

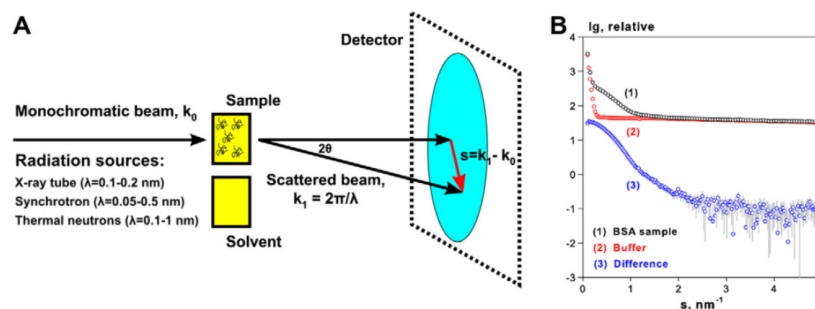


Abbildung 5.9: Das Standardschema der SAS-Experimente.

(A) Das X33-Instrument nutzt Si 111 Monochromator ($\lambda = 0,15 \text{ nm}$) und MAR345 als den SAXS-Detektor, der die unter kleinen Winkeln (2θ) gestreute Intensität I aufnimmt. 2θ ist der Winkel zwischen einem Einfall- und Streuungsstrahl. Zu der gestreuten Intensität I gehört ein Wellenvektor k_1 und der Wellenvektorübertrag ist definiert als $s = k_1 - k_0$. (B) Das Streuungsmuster von BSA (*bovine serum albumin*) in Pufferlösung: Die Differenzkurve wird aus den Streukurven der gelösten Proteinprobe und des Puffers gebildet. Die Abbildung wurde von Mertens *et al.* (2010) dargestellt. Y-Achse steht für den Logarithmus der Streuungsintensität I und X-Achse steht für den Wellenvektorübertrag s [nm^{-1}].

Um aus der Streukurve (1D SAXS-Daten) ein *low-resolution* 3D-Modell der Proteingestalt zu ermitteln (d.h. *ab initio*-Methode; Abbildung 5.10), wurde das Programm GASBOR22 angewendet (Svergun *et al.* 2001).

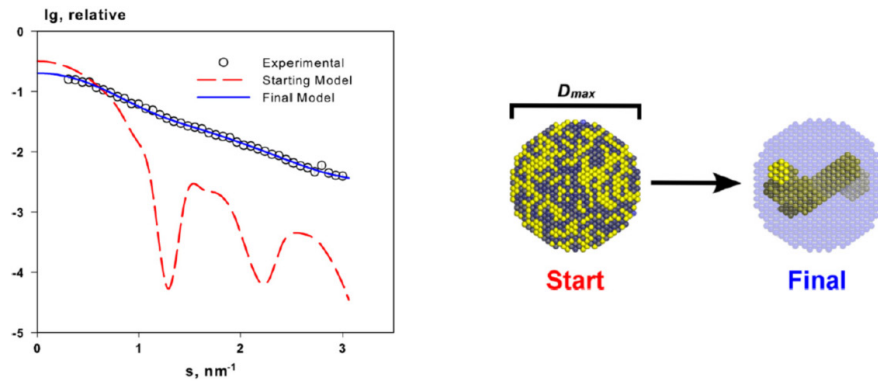


Abbildung 5.10: *Ab initio*-Methode.

Die algorithmischen Programme (z.B. DAMMIN, GASBOR) präsentieren ein Gefüge aus dicht gepackten Kugeln innerhalb eines Kugelvolumens mit einem maximalen Teilchendurchmesser (D_{\max}), der mit GNOM-Programm aus einer experimentell ermittelten Streukurve berechnet wurde. Die *dummy*-Atome bzw. -Reste werden so lange entfernt bzw. umgeordnet bis der Formfaktor (Kapitel 5.3.8.3, Formel) der berechneten Proteinstruktur mit der Streukurve übereinstimmt. Beim Start der Berechnung besteht das Kugelvolumen aus Protein- (gelb) und Lösungsmittel-(blau)-Kugeln. Am Ende wird eine kompakte Proteinstruktur (gelbe Kugeln) erzeugt. Die Abbildung wurde von Mertens *et al.* (2010) erstellt.

6 Referenzen

- Agervald, A., X. Zhang, K. Stensjo, E. Devine and P. Lindblad (2010). "CalA, a cyanobacterial AbrB protein, interacts with the upstream region of *hypC* and acts as a repressor of its transcription in the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain PCC 7120." Appl Environ Microbiol **76**(3): 880-890.
- Antoniewski, C., B. Savelli and P. Stragier (1990). "The *spoIII* gene, which regulates early developmental steps in *Bacillus subtilis*, belongs to a class of environmentally responsive genes." J Bacteriol **172**(1): 86-93.
- Arnold-Schulz-Gahmen, B., V. Salti-Montesanto, J. Nguyen, L. Hirschbein and F. Le Hégarat (1994). "The *Bacillus subtilis* nucleoid-associated protein HPB12 strongly compacts DNA." J Bacteriol **176**(1): 50-60.
- Asen, I., S. Djuranovic, A. N. Lupas and K. Zeth (2009). "Crystal structure of SpoVT, the final modulator of gene expression during spore development in *Bacillus subtilis*." J Mol Biol **386**(4): 962-975.
- Ballesteros, J. A., X. Deupi, M. Olivella, E. E. Haaksma and L. Pardo (2000). "Serine and threonine residues bend alpha-helices in the chi(1) = g(-) conformation." Biophys J **79**(5): 2754-2760.
- Banse, A. V., A. Chastanet, L. Rahn-Lee, E. C. Hobbs and R. Losick (2008). "Parallel pathways of repression and antirepression governing the transition to stationary phase in *Bacillus subtilis*." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(40): 15547-15552.
- Beloin, C., J. Jeusset, B. Revet, G. Mirambeau, F. Le Hégarat and E. Le Cam (2003). "Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein." J Biol Chem **278**(7): 5333-5342.
- Benson, L. M., J. L. Vaughn, M. A. Strauch, B. G. Bobay, R. Thompson, S. Naylor and J. Cavanagh (2002). "Macromolecular assembly of the transition state regulator AbrB in its unbound and complexed states probed by microelectrospray ionization mass spectrometry." Anal Biochem **306**(2): 222-227.
- BiacoreAB (1999). BIAevaluation software handbook version 3.1.
- Bobay, B. G., A. Andreeva, G. A. Mueller, J. Cavanagh and A. G. Murzin (2005). "Revised structure of the AbrB N-terminal domain unifies a diverse superfamily of putative DNA-binding proteins." FEBS Lett **579**(25): 5669-5674.
- Bobay, B. G., L. Benson, S. Naylor, B. Feeney, A. C. Clark, M. B. Goshe, M. A. Strauch, R. Thompson and J. Cavanagh (2004). "Evaluation of the DNA binding tendencies of the transition state regulator AbrB." Biochemistry **43**(51): 16106-16118.
- Bobay, B. G., G. A. Mueller, R. J. Thompson, A. G. Murzin, R. A. Venters, M. A. Strauch and J. Cavanagh (2006). "NMR structure of AbhN and comparison with AbrBN: FIRST insights into the DNA binding promiscuity and specificity of AbrB-like transition state regulator proteins." J Biol Chem **281**(30): 21399-21409.
- Bohn, L., L. Josefsen, A. S. Meyer and S. K. Rasmussen (2007). "Quantitative analysis of phytate globoids isolated from wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase." J Agric Food Chem **55**(18): 7547-7552.
- Bordbar, A. K., A. A. Saboury and A. A. Moosavi-Movahedi (1996). "The shapes of scatchard plots for systems with two sets of binding sites." IJBMB **24**(3): 172-175.
- Boylan, S. A., A. R. Redfield and C. W. Price (1993). "Transcription factor sigma B of *Bacillus subtilis* controls a large stationary-phase regulon." J Bacteriol **175**(13): 3957-3963.
- Breslow, E. (1970). "Optical activity of bovine neurophysins and their peptide complexes in the near ultraviolet." Proc Natl Acad Sci U S A **67**(2): 493-500.
- Britton, R. A., P. Eichenberger, J. E. Gonzalez-Pastor, P. Fawcett, R. Monson, R. Losick and A. D. Grossman (2002). "Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **184**(17): 4881-4890.
- Buske, F. A., J. S. Mattick and T. L. Bailey (2011). "Potential *in vivo* roles of nucleic acid triple-helices." Landes Bioscience **8**: 427-439.
- Cavanagh, J., R. Thompson, B. Bobay, L. M. Benson and S. Naylor (2002). "Stoichiometries of protein-protein/DNA binding and conformational changes for the transition-state regulator AbrB measured by pseudo cell-size exclusion chromatography-mass spectrometry." Biochemistry **41**(25): 7859-7865.
- Christoffersen, C. T., K. E. Bornfeldt, C. M. Rotella, N. Gonzales, H. Vissing, R. M. Shymko, J. ten Hoeve, J. Groffen, N. Heisterkamp and P. De Meyts (1994). "Negative cooperativity in the

- insulin-like growth factor-I receptor and a chimeric IGF-I/insulin receptor." *Endocrinology* **135**(1): 472-475.
- Chumsakul, O., H. Takahashi, T. Oshima, T. Hishimoto, S. Kanaya, N. Ogasawara and S. Ishikawa (2011). "Genome-wide binding profiles of the *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB and its homolog Abh reveals their interactive role in transcriptional regulation." *Nucleic Acids Res* **39**(2): 414-428.
- Coles, M., S. Djuranovic, J. Soding, T. Frickey, K. Koretke, V. Truffault, J. Martin and A. N. Lupas (2005). "AbrB-like transcription factors assume a swapped hairpin fold that is evolutionarily related to double-psi beta barrels." *Structure* **13**(6): 919-928.
- Coll, M., C. A. Frederick, A. H. Wang and A. Rich (1987). "A bifurcated hydrogen-bonded conformation in the d(A.T) base pairs of the DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) and its complex with distamycin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(23): 8385-8389.
- Common, F. H. (1989). "Biological availability of phosphorus for pigs." *Nature* **143**: 370-380.
- Compton, L. A. and W. C. Johnson, Jr. (1986). "Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication." *Anal Biochem* **155**(1): 155-167.
- Contursi, P., K. D'Ambrosio, L. Pirone, E. Pedone, T. Aucelli, Q. She, G. De Simone and S. Bartolucci (2011). "C68 from the *Sulfolobus islandicus* plasmid-virus pSSVx is a novel member of the AbrB-like transcription factor family." *Biochem J* **435**(1): 157-166.
- Cosby, W. M. and P. Zuber (1997). "Regulation of *Bacillus subtilis* *sigmaH* (spo0H) and AbrB in response to changes in external pH." *J Bacteriol* **179**(21): 6778-6787.
- Dame, R. T. (2005). "The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin." *Mol Microbiol* **56**(4): 858-870.
- De Meyts, P. (1994). "The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-I receptor binding and negative co-operativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling." *Diabetologia* **37 Suppl 2**: S135-148.
- De Meyts, P. (2004). "Insulin and its receptor: structure, function and evolution." *Bioessays* **26**(12): 1351-1362.
- De Meyts, P. and J. Whittaker (2002). "Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design." *Nat Rev Drug Discov* **1**(10): 769-783.
- Deutscher, J., E. Kuster, U. Bergstedt, V. Charrier and W. Hillen (1995). "Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria." *Mol Microbiol* **15**(6): 1049-1053.
- Dolgova, O. (2011). *DNA-Bindungseigenschaften der C terminalen Domäne von AbrB und die AbbA-Antirepressorwirkung auf AbrB* Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Dong, T. C., S. M. Cutting and R. J. Lewis (2004). "DNA-binding studies on the *Bacillus subtilis* transcriptional regulator and AbrB homologue, SpoVT." *FEMS Microbiol Lett* **233**(2): 247-256.
- Drlica, K. and J. Rouviere-Yaniv (1987). "Histone-like proteins of bacteria." *Microbiol Rev* **51**(3): 301-319.
- Ezomo, O. F., K. Takahashi, Y. Horie, M. S. Mustak and S. Meshitsuka (2010). "Circular Dichroism studies on C-terminal Zinc Finger domain of transcription factor GATA-2." *Yonago Acta medica* **53**: 25-28.
- Fagerstam, J. U., L. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Lofas, B. Persson, H. Roos and I. Ronnberg (1991). "Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology." *Biotechniques* **11**: 620-627.
- Feigin, L. A. and D. I. Svergun (1987). *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*, Plenum Press/ Springer.
- Fisher, S. H., M. A. Strauch, M. R. Atkinson and L. V. Wray, Jr. (1994). "Modulation of *Bacillus subtilis* catabolite repression by transition state regulatory protein AbrB." *J Bacteriol* **176**(7): 1903-1912.
- Fletcher, C. M., T. V. Pestova, C. U. Hellen and G. Wagner (1999). "Structure and interactions of the translation initiation factor *eIF1*." *EMBO J* **18**(9): 2631-2637.
- Fujita, M., J. E. Gonzalez-Pastor and R. Losick (2005). "High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **187**(4): 1357-1368.
- Fujita, M. and R. Losick (2005). "Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A." *Genes Dev* **19**(18): 2236-2244.
- Fujita, M. and Y. Sadaie (1998). "Rapid isolation of RNA polymerase from sporulating cells of *Bacillus subtilis*." *Gene* **221**(2): 185-190.

- Fujita, Y., Y. Miwa, S. Tojo and K. Hirooka (2007). Carbon catabolite control and metabolic networks mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*. Y. Fujita, Transworld Research Network. **37/661**.
- Furbass, R., M. Gocht, P. Zuber and M. A. Marahiel (1991a). "Interaction of AbrB, a transcriptional regulator from *Bacillus subtilis* with the promoters of the transition state-activated genes *tycA* and *spoVG*." *Mol Gen Genet* **225**(3): 347-354.
- Furbass, R. and M. A. Marahiel (1991b). "Mutant analysis of interaction of the *Bacillus subtilis* transcription regulator AbrB with the antibiotic biosynthesis gene *tycA*." *FEBS Lett* **287**(1-2): 153-156.
- Gaur, N. K., K. Cabane and I. Smith (1988). "Structure and expression of the *Bacillus subtilis* *sin* operon." *J Bacteriol* **170**(3): 1046-1053.
- GE-Healthcare (1999). *Biacore3000 Instrument Handbook*.
- Goobes, R., O. Cohen and A. Minsky (2002). "Unique condensation patterns of triplex DNA: physical aspects and physiological implications." *Nucleic Acids Res* **30**(10): 2154-2161.
- Greiner, R., U. Konietzny and K. D. Jany (1993). "Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*." *Arch Biochem Biophys* **303**(1): 107-113.
- Greiner, R., B. L. Lim, C. Cheng and N. G. Carlsson (2007). "Pathway of phytate dephosphorylation by beta-propeller phytases of different origins." *Can J Microbiol* **53**(4): 488-495.
- Guinier, A. and G. Fournet (1955). "Small angle scattering of X-rays." *Wiley* **19**(93).
- Habauzit, D., J. Chopineau and B. Roig (2007). "SPR-based biosensors: a tool for biodetection of hormonal compounds." *Anal Bioanal Chem* **387**(4): 1215-1223.
- Hammes, G. G. (2000). *Thermodynamics and kinetics for the biological sciences*, A John Wiley & Sons, Inc., publication.
- Hamoen, L. W., D. Kausche, M. A. Marahiel, D. van Sinderen, G. Venema and P. Serror (2003). "The *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB binds to the -35 promoter region of *comK*." *FEMS Microbiol Lett* **218**(2): 299-304.
- Hamon, M. A., N. R. Stanley, R. A. Britton, A. D. Grossman and B. A. Lazazzera (2004). "Identification of AbrB-regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **52**(3): 847-860.
- Hayatsu, H. and T. Ukita (1967). "The selective degradation of pyrimidines in nucleic acids by permanganate oxidation." *Biochem Biophys Res Commun* **29**(4): 556-561.
- Hayatsu, H. and T. Ukita (1967). "The selective degradation of pyrimidines in nucleic acids by permanganate oxidation." *Biochemical and biophysical research communications* **29**: 556-561.
- Hengge-Aronis, R. (1999). "Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*." *Curr Opin Microbiol* **2**(2): 148-152.
- Higgins, N. P., X. Yang, Q. Fu and J. R. Roth (1996). "Surveying a supercoil domain by using the gamma delta resolution system in *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* **178**(10): 2825-2835.
- Hoch, J. A. (1993). "Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*." *Annu Rev Microbiol* **47**: 441-465.
- Hulett, F. M., J. Lee, L. Shi, G. Sun, R. Chesnut, E. Sharkova, M. F. Duggan and N. Kapp (1994). "Sequential action of two-component genetic switches regulates the PHO regulon in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **176**(5): 1348-1358.
- Idriss, E. E., O. Makarewicz, A. Farouk, K. Rosner, R. Greiner, H. Bochow, T. Richter and R. Borriss (2002). "Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect." *Microbiology* **148**(Pt 7): 2097-2109.
- Iida, S. and H. Hayatsu (1971). "The permanganate oxidation of thymidine and thymidylic acid." *Biochim Biophys Acta* **228**(1): 1-8.
- Iida, S. and H. Hayatsu (1971). "The permanganate oxidation of thymidine and thymidylic acid." *Biophys. Acta* **228**: 1-8.
- Ishii, A. and Y. Hihara (2008). "An AbrB-like transcriptional regulator, Sli0822, is essential for the activation of nitrogen-regulated genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Plant Physiol* **148**(1): 660-670.
- Jones, A. L., M. D. Hulett, J. G. Altin, P. Hogg and C. R. Parish (2004). "Plasminogen is tethered with high affinity to the cell surface by the plasma protein, histidine-rich glycoprotein." *J Biol Chem* **279**(37): 38267-38276.
- Kerovuo, J., I. Lappalainen and T. Reinikainen (2000). "The metal dependence of *Bacillus subtilis* phytase." *Biochem Biophys Res Commun* **268**(2): 365-369.

- Kerovuo, J., M. Lauraeus, P. Nurminen, N. Kalkkinen and J. Apajalahti (1998). "Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*." *Appl Environ Microbiol* **64**(6): 2079-2085.
- Kim, H. W., Y. O. Kim, J. H. Lee, K. K. Kim and Y. J. Kim (2003). "Isolation and characterization of a phytase with improved properties from *Citrobacter braakii*." *Biotechnol Lett* **25**(15): 1231-1234.
- Kim, Y. O., J. K. Lee, H. K. Kim, J. H. Yu and T. K. Oh (1998). "Cloning of the thermostable phytase gene (*phy*) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiol Lett* **162**(1): 185-191.
- Klein, W. and M. A. Marahiel (2002). "Structure-function relationship and regulation of two *Bacillus subtilis* DNA-binding proteins, HBSu and AbrB." *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**(3): 232-329.
- Knippers, R. (2001). *Molekulare Genetik*, Georg Thieme Verlag.
- Kochetkov, N. K. and E. I. Budovskii (1972). *Organic Chemistry of Nucleic Acids*, Plenum Press.
- Kochetkov, N. K. and E. I. Budovskii (1972). "Organic Chemistry of Nucleic Acids." *Plenum, New York, Part B*: 408-412.
- Konarev, P. V., M. V. Petoukhov, V. V. Volkov and D. I. Svergun (2006). "ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis." *J Appl Crystallogr* **39**: 277-286.
- Konarev, P. V., V. V. Volkov, A. V. Sokolova, M. H. J. Koch and D. I. Svergun (2003). "Primus: a windows PC-based system for small-angle scattering data analysis." *J Appl Crystallogr* **36**: 1277-1282.
- Kornberg, R. D. and A. Klug (1981). "The nucleosome." *Sci Am* **244**(2): 52-64.
- Kypr, J., I. Kejnovska, D. Rencuk and M. Vorlickova (2009). "Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA." *Nucleic Acids Res* **37**(6): 1713-1725.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-685.
- Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer.
- Lange, R. and R. Hengge-Aronis (1994). "The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability." *Genes Dev* **8**(13): 1600-1612.
- Lees, J. G., A. J. Miles, F. Wien and B. A. Wallace (2006). "A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space." *Bioinformatics* **22**(16): 1955-1962.
- Leon, E., G. Navarro-Aviles, S. G. M., C. Flores-Flores, M. Rico, C. Gonzalez, F. J. Murillo, M. Elias-Arnanz, M. A. Jimenez and S. Padmanabhan (2010). "A bacterial antirepressor with SH3 domain topology mimics operator DNA in sequestering the repressor DNA recognition helix." *Nucleic Acids Res* **38**(15): 5226-5241.
- Licht, A. and S. Brantl (2006). "Transcriptional repressor CcpN from *Bacillus subtilis* compensates asymmetric contact distribution by cooperative binding." *J Mol Biol* **364**(3): 434-448.
- Licht, A. and S. Brantl (2006). "Transcriptional repressor CcpN from *Bacillus subtilis* compensates asymmetric contact distribution by cooperative binding." *J. Mol. Biol.* **364**: 434-448.
- Lieman-Hurwitz, J., M. Haimovich, G. Shalev-Malul, A. Ishii, Y. Hihara, A. Gaathon, M. Lebendiker and A. Kaplan (2009). "A cyanobacterial AbrB-like protein affects the apparent photosynthetic affinity for CO₂ by modulating low-CO₂-induced gene expression." *Environ Microbiol* **11**(4): 927-936.
- Loris, R., I. Marianovsky, J. Lah, T. Laeremans, H. Engelberg-Kulka, G. Glaser, S. Muyldermans and L. Wyns (2003). "Crystal structure of the intrinsically flexible addiction antidote MazE." *J Biol Chem* **278**(30): 28252-28257.
- Lott, J. N. A., I. Ockenden, V. Raboy and G. D. Batten (2000). "Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: A global estimate." *Seed Science Research* **10**: 11-33.
- Lucking, G., M. K. Dommel, S. Scherer, A. Fouet and M. Ehling-Schulz (2009). "Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR." *Microbiology* **155**(Pt 3): 922-931.
- Luo, Y. and J. D. Helmann (2009). "Extracytoplasmic function sigma factors with overlapping promoter specificity regulate sublancin production in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **191**(15): 4951-4958.
- Luscombe, N. M., R. A. Laskowski and J. M. Thornton (2001). "Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level." *Nucleic Acids Res* **29**(13): 2860-2874.
- Maenz, D. D., C. M. Engele-Schaan, R. W. Newkirk and H. L. Classen (1999). "The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-

- susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal." Animal Feed Science and Technology **81**(3): 177-192.
- Makarewicz, O. (2006). Regulation der Phytaseexpression in *Bacillus amyloliquefaciens* Doktorarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Makarewicz, O., S. Dubrac, T. Msadek and R. Borriss (2006). "Dual role of the PhoP approximately P response regulator: *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 phytase gene transcription is directed by positive and negative interactions with the *phyC* promoter." J Bacteriol **188**(19): 6953-6965.
- Makarewicz, O., S. Dubrac, T. Msadek and R. Borriss (2006). "Dual role of the PhoP~P response regulator: *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 phytase gene transcription is directed by positive and negative interactions with the *phyC* promoter." J Bacteriol **188**(19): 6953-6965.
- Makarewicz, O., S. Neubauer, C. Preusse and R. Borriss (2008). "Transition state regulator AbrB inhibits transcription of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 phytase through binding at two distinct sites located within the extended *phyC* promoter region." J Bacteriol **190**(19): 6467-6474.
- Makarewicz, O., S. Neubauer, C. Preusse and R. Borriss (2008). "Transition state regulator AbrB inhibits transcription of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 phytase through binding at two distinct sites located within the extended *phyC* promoter region." J Bacteriol **190**(19): 6467-6474.
- Marahiel, M. A., M. M. Nakano and P. Zuber (1993). "Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*." Mol Microbiol **7**(5): 631-636.
- Marahiel, M. A., P. Zuber, G. Czekay and R. Losick (1987). "Identification of the promoter for a peptide antibiotic biosynthesis gene from *Bacillus brevis* and its regulation in *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **169**(5): 2215-2222.
- Maxam, A. M. and W. Gilbert (1977). "A new method for sequencing DNA." Proc Natl Acad Sci **74**: 560-564.
- Maxam, A. M. and W. Gilbert (1980). "Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages." Methods Enzymol **65**(1): 499-560.
- Mega, J. A. (1982). "Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significans and methods of analysis." J Agric Foot Chem **30**: 1-9.
- Mertens, H. D. and D. I. Svergun (2010). "Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering." J Struct Biol **172**(1): 128-141.
- Mirel, D. B., W. F. Estacio, M. Mathieu, E. Olmsted, J. Ramirez and L. M. Marquez-Magana (2000). "Environmental regulation of *Bacillus subtilis* sigma(D)-dependent gene expression." J Bacteriol **182**(11): 3055-3062.
- Miwa, Y., A. Nakata, A. Ogiwara, M. Yamamoto and Y. Fujita (2000). "Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*." Nucleic Acids Res **28**(5): 1206-1210.
- Molle, V., M. Fujita, S. T. Jensen, P. Eichenberger, J. E. Gonzalez-Pastor, J. S. Liu and R. Losick (2003). "The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **50**(5): 1683-1701.
- Mosbaek, C. R., D. Nolan, E. Persson, D. I. Svergun, J. T. Bukrinsky and B. Vestergaard (2010). "Extensive small-angle X-ray scattering studies of blood coagulation factor VIIa reveal interdomain flexibility." Biochemistry **49**(45): 9739-9745.
- Msadek, T. (1999). "When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*." Trends Microbiol **7**(5): 201-207.
- Mülhardt, C. (2009). Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics, Spektrum Akademischer Verlag.
- Munteanu, M. G., K. Vlahovicek, S. Parthasaraty, I. Simon and S. Pongor (1998). "Rod models of DNA: sequence-dependent anisotropic elastic modelling of local bending phenomena." Trends Biochem Sci **23**(9): 341-346.
- Murray, E. J., M. A. Strauch and N. R. Stanley-Wall (2009). "SigmaX is involved in controlling *Bacillus subtilis* biofilm architecture through the AbrB homologue Abh." J Bacteriol **191**(22): 6822-6832.
- Nakano, M. M. and P. Zuber (1993). "Mutational analysis of the regulatory region of the *srfA* operon in *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **175**(10): 3188-3191.
- Navarro-Avilés, G., M. A. Jiménez, M. C. Pérez-Marín, C. González, M. Rico, F. J. Murillo, M. Elías-Arnanz and S. Padmanabhan (2007). "Structural basis for operator and antirepressor recognition by *Myxococcus xanthus* CarA repressor." Mol Microbiol **63**: 980-994.

- Neubauer, S. (2008). Untersuchung der transkriptionalen Regulation des Phytasegens aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 durch PhoP, AbrB und CcpA Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Neubauer, S., R. Borriss and O. Makarewicz (2012). "Thermodynamic and molecular analysis of the AbrB-binding sites within the *phyC*-region of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45." Mol Genet Genomics **287**(2): 111-122.
- Neubauer, S., R. Borriss and O. Makarewicz (2012). "Thermodynamic and molecular analysis of the AbrB-binding sites within the *phyC*-region of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45." Mol Genet Genomics **287**(2): 111-122.
- O'Reilly, M. and K. M. Devine (1997). "Expression of AbrB, a transition state regulator from *Bacillus subtilis*, is growth phase dependent in a manner resembling that of Fis, the nucleoid binding protein from *Escherichia coli*." J Bacteriol **179**(2): 522-529.
- Oh, B. C., M. H. Kim, B. S. Yun, W. C. Choi, S. C. Park, S. C. Bae and T. K. Oh (2006). "Ca(2+)-inositol phosphate chelation mediates the substrate specificity of beta-propeller phytase." Biochemistry **45**(31): 9531-9539.
- Ohniwa, R. L., Y. Ushijima, S. Saito and K. Morikawa (2011). "Proteomic analyses of nucleoid-associated proteins in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*." PLoS One **6**(4): e19172.
- Oliveira, P. and P. Lindblad (2008). "An AbrB-Like protein regulates the expression of the bidirectional hydrogenase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." J Bacteriol **190**(3): 1011-1019.
- Pen, J., T. C. Verwoerd, P. A. Van Paridon, R. F. Beudeker, P. J. M. Van den Elzen, K. Geerse, J. D. Van der Klis, H. A. J. Versteegh, A. J. J. Van Ooyen and A. Hoekema (1993). "Phytase-containing Transgenic Seeds as a Novel Feed Additive for Improved Phosphorus Utilization." Nature Biotechnology **11**: 811 - 814
- Perczel, A. and G. D. Fasman (1992). "Quantitative analysis of cyclic beta-turn models." Protein Sci **1**(3): 378-395.
- Perego, M. and J. A. Hoch (1988). "Sequence analysis and regulation of the *hpr* locus, a regulatory gene for protease production and sporulation in *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **170**(6): 2560-2567.
- Perego, M., G. B. Spiegelman and J. A. Hoch (1988). "Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **2**(6): 689-699.
- Phillips, J. H. (1967). The reaction of hydroxylamine with pyrimidine bases. Methods in enzymology Part A. L. Grossman and M. K., Elsevier Inc. **12**: 34-38.
- Phillips, J. H. (1967). "The reaction of hydroxylamine with pyrimidine bases." Methods Enzymol **12**: 34-38.
- Phillips, Z. E. and M. A. Strauch (2001). "Role of Cys54 in AbrB multimerization and DNA-binding activity." FEMS Microbiol Lett **203**(2): 207-210.
- Phillips, Z. E. and M. A. Strauch (2002). "Bacillus subtilis sporulation and stationary phase gene expression." Cell Mol Life Sci **59**(3): 392-402.
- Provencher, S. W. and J. Glockner (1981). "Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism." Biochemistry **20**(1): 33-37.
- Ptashne, M. (1986). "Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance." Nature **322**(6081): 697-701.
- Pul, Ü. and R. Wagner (2007). "Nukleoid-assoziierte Proteine bei Mikroorganismen." BIOspektrum **5**: 495-497.
- Qian, Q., C. Y. Lee, J. D. Helmann and M. A. Strauch (2002). "AbrB is a regulator of the sigma(W) regulon in *Bacillus subtilis*." FEMS Microbiol Lett **211**(2): 219-223.
- Ramstrom, H., S. Sanglier, E. Leize-Wagner, C. Philippe, A. Van Dorsselaer and J. Haiech (2003). "Properties and regulation of the bifunctional enzyme HPr kinase/phosphatase in *Bacillus subtilis*." J Biol Chem **278**(2): 1174-1185.
- Rao, J. E. and N. L. Craig (2001). "Selective recognition of pyrimidine motif triplexes by a protein encoded by the bacterial transposon Tn7." J Mol Biol **307**: 1161-1170.
- Reddy, N. R., S. K. Sathe and D. K. Salunkhe (1982). "Phytates in legumes and cereals." Adv Food Res **28**: 1-92.
- Ritzefeld, M. and N. Sewald (2012). "Real-Time Analysis of Specific Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance." J Amino Acids **2012**: 816032.
- Roessle, M. R., R. Klaering, R. Ristau, B. Robrahn, D. Jahn, T. Gehrmann, P. Konarev, A. Round, S. Fiedler, C. Hermes and D. Svergun (2007). "Upgrade of the small-angle X-ray scattering

- beamline X33 at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg." *Journal of Applied Crystallography* **40**: 190-194.
- Rubin, C. M. and C. W. Schmid (1980). "Pyrimidine-specific chemical reactions useful for DNA sequencing." *Nucleic Acids Research* **8**: 4613-4619.
- Rubin, C. M. and C. W. Schmid (1980). "Pyrimidine-specific chemical reactions useful for DNA sequencing." *Nucleic Acids Res* **8**(20): 4613-4619.
- Rychlik, W., W. J. Spencer and R. E. Rhoads (1990). "Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro." *Nucleic Acids Res* **18**(21): 6409-6412.
- Saile, E. and T. M. Koehler (2002). "Control of anthrax toxin gene expression by the transition state regulator *abrB*." *J Bacteriol* **184**(2): 370-380.
- Sajidan, A., A. Farouk, R. Greiner, P. Jungblut, E. C. Muller and R. Borriss (2004). "Molecular and physiological characterisation of a 3-phytase from soil bacterium *Klebsiella* sp. ASR1." *Appl Microbiol Biotechnol* **65**(1): 110-118.
- Schlegel, H. G. (2007). *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag.
- Schleif, R. (1987). "Gene regulation: why should DNA loop?" *Nature* **327**(6121): 369-370.
- Schleif, R. (1992). "DNA looping." *Annu Rev Biochem* **61**: 199-223.
- Shafikhani, S. H. and T. Leighton (2004). "AbrB and Spo0E control the proper timing of sporulation in *Bacillus subtilis*." *Curr Microbiol* **48**(4): 262-269.
- Shafikhani, S. H., I. Mandic-Mulec, M. A. Strauch, I. Smith and T. Leighton (2002). "Postexponential regulation of *sin* operon expression in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* **184**(2): 564-571.
- Shakola, F. (2010). *Untersuchung der AbrB-Bindungsstellen im phyC-Promotor aus Bacillus amyloliquefaciens FZB45* Bachelorarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Shieh, T. R. and J. H. Ware (1968). "Survey of microorganism for the production of extracellular phytase." *Appl Microbiol* **16**(9): 1348-1351.
- Shin, S., N. C. Ha, B. C. Oh, T. K. Oh and B. H. Oh (2001). "Enzyme mechanism and catalytic property of beta propeller phytase." *Structure* **9**(9): 851-858.
- Siebenlist, U., R. B. Simpson and W. Gilbert (1980). "*E. coli* RNA polymerase interacts homologously with two different promoters." *Cell* **20**(2): 269-281.
- Siebenlist, U., R. B. Simpson and W. Gilbert (1980). "*E. coli* RNA Polymerase interacts homologously with two different promoters." *Cell* **20**: 269-281.
- Sonenshein, A. L. (2005). "CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria." *Curr Opin Microbiol* **8**(2): 203-207.
- Sorensen, J. J., J. T. Nielsen and M. Petersen (2004). "Solution structure of a dsdna:lna triplex." *Nucleic Acids Res* **32**: 6078.
- Sreerama, N., S. Y. Venyaminov and R. W. Woody (1999). "Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy." *Protein Sci* **8**(2): 370-380.
- Sreerama, N., S. Y. Venyaminov and R. W. Woody (2000a). "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis." *Anal Biochem* **287**(2): 243-251.
- Sreerama, N. and R. W. Woody (1993). "A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism." *Anal Biochem* **209**(1): 32-44.
- Sreerama, N. and R. W. Woody (2000b). "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set." *Anal Biochem* **287**(2): 252-260.
- Strauch, M., V. Webb, G. Spiegelman and J. A. Hoch (1990). "The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(5): 1801-1805.
- Strauch, M. A. (1995a). "AbrB modulates expression and catabolite repression of a *Bacillus subtilis* ribose transport operon." *J Bacteriol* **177**(23): 6727-6731.
- Strauch, M. A. (1995b). "Delineation of AbrB-binding sites on the *Bacillus subtilis* *spo0H*, *kinB*, *ftsAZ*, and *pbpE* promoters and use of a derived homology to identify a previously unsuspected binding site in the *bsuB1* methylase promote." *J Bacteriol* **177**(23): 6999-7002.
- Strauch, M. A. (1995c). "*In vitro* binding affinity of the *Bacillus subtilis* AbrB protein to six different DNA target regions." *J Bacteriol* **177**(15): 4532-4536.
- Strauch, M. A. and M. Ayazifar (1995d). "Bent DNA is found in some, but not all, regions recognized by the *Bacillus subtilis* AbrB protein." *Mol Gen Genet* **246**(6): 756-760.
- Strauch, M. A., B. G. Bobay, J. Cavanagh, F. Yao, A. Wilson and Y. Le Breton (2007). "Abh and AbrB control of *Bacillus subtilis* antimicrobial gene expression." *J Bacteriol* **189**(21): 7720-7732.

- Strauch, M. A. and J. A. Hoch (1993). "Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression." Mol Microbiol **7**(3): 337-342.
- Strauch, M. A., M. Perego, D. Burbulys and J. A. Hoch (1989a). "The transition state transcription regulator AbrB of *Bacillus subtilis* is autoregulated during vegetative growth." Mol Microbiol **3**(9): 1203-1209.
- Strauch, M. A., G. B. Spiegelman, M. Perego, W. C. Johnson, D. Burbulys and J. A. Hoch (1989b). "The transition state transcription regulator *abrB* of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein." EMBO J **8**(5): 1615-1621.
- Sullivan, D. M., B. G. Bobay, D. J. Kojetin, R. J. Thompson, M. Rance, M. A. Strauch and J. Cavanagh (2008). "Insights into the nature of DNA binding of AbrB-like transcription factors." Structure **16**(11): 1702-1713.
- Sullivan, D. M., B. G. Bobay, D. J. Kojetin, R. j. Thompson, M. Rance, M. A. Strauch and J. Cavanagh (2008). "Insights into the nature of DNA binding of AbrB-like transcription factors." Structure **16**(11): 1702-1713.
- Sun, G., S. M. Birkey and F. M. Hulett (1996). "Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **19**(5): 941-948.
- Svergun, D. I. (1992). "Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria." J Appl Cryst **25**: 495-503.
- Svergun, D. I. (2010). "Small-angle X-ray and neutron scattering as a tool for structural systems biology." Biol Chem **391**(7): 737-743.
- Svergun, D. I. and M. H. J. Koch (2003). "Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution." Rep Prog Phys **66**: 1735-1782.
- Svergun, D. I., M. V. Petoukhov and M. H. Koch (2001). "Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering." Biophys J **80**(6): 2946-2953.
- Talukder, A. A., A. Iwata, A. Nushimura, S. Ueda and A. Ishihama (1999). "Growth Phase-Dependent Variation in Protein Composition of the *Escherichia coli* Nucleoid." J Bacteriol **181**(20): 361-6370.
- Torre, M., A. R. Rodriguez and F. Saura-Calixto (1991). "Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability." Crit Rev Food Sci Nutr **30**(1): 1-22.
- Torres, J., S. Dominguez, M. F. Cerda, G. Obal, A. Mederos, R. F. Irvine, A. Diaz and C. Kremer (2005). "Solution behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of multivalent cations. Prediction of a neutral pentamagnesium species under cytosolic/nuclear conditions." J Inorg Biochem **99**(3): 828-840.
- Tsyglakova, M. (2010). Einfluss von CcpA auf die Genexpression von *phyC* aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 Diplom, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Tunis-Schneider, M. J. and M. F. Maestre (1970). "Circular dichroism spectra of oriented and unoriented deoxyribonucleic acid films - a preliminary study." J Mol Biol **52**(3): 521-541.
- Turbadar, T. (1959). "Complete absorption of light by thin metal films." Proc Phy Soc **73**: 40 -44.
- Ullah, A. H. and D. M. Gibson (1987). "Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization." Prep Biochem **17**(1): 63-91.
- Van Etten, R. L., R. Davidson, P. E. Stevis, H. MacArthur and D. L. Moore (1991). "Covalent structure, disulfide bonding, and identification of reactive surface and active site residues of human prostatic acid phosphatase." J Biol Chem **266**(4): 2313-2319.
- Van Stokkum, I. H., H. J. Spoelder, M. Bloemendal, R. van Grondelle and F. C. Groen (1990). "Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra." Anal Biochem **191**(1): 110-118.
- Vaughn, J. L., V. Feher, S. Naylor, M. A. Strauch and J. Cavanagh (2000). "Novel DNA binding domain and genetic regulation model of *Bacillus subtilis* transition state regulator *abrB*." Nat Struct Biol **7**(12): 1139-1146.
- Voet, D., J. G. Voet and C. W. Pratt (2002). Lehrbuch der Biochemie, Wiley-VCH.
- Voet, D., J. G. Voet and C. W. Pratt (2002). "Lehrbuch der Biochemie." Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Wallace, B. A. and R. W. Janes (2009). Modern techniques for circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. London, IOS Press.
- Weatherford, D. W. and F. R. Salemme (1979). "Conformations of twisted parallel beta-sheets and the origin of chirality in protein structures." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(1): 19-23.
- Weir, J., M. Predich, E. Dubnau, G. Nair and I. Smith (1991). "Regulation of *spo0H*, a gene coding for the *Bacillus subtilis* sigma H factor." J Bacteriol **173**(2): 521-529.

- Whitmore, L. and B. A. Wallace (2004). "DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data." Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W668-673.
- Whitmore, L. and B. A. Wallace (2004). "DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data." Nucleic Acids Res **32**: W668-673.
- Whitmore, L. and B. A. Wallace (2008). "Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases." Biopolymers **89**(5): 392-400.
- Wolf, T. and K. Schnetz (2007). "Kontrolle durch das Nucleoid-assoziierte Protein H-NS." BIOspektrum **5**: 492-494.
- Worcel, A. and E. Burgi (1972). "On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*." J Mol Biol **71**(2): 127-147.
- Xu, K., D. Clark and M. A. Strauch (1996a). "Analysis of *abrB* mutations, mutant proteins, and why *abrB* does not utilize a perfect consensus in the -35 region of its sigma A promoter." J Biol Chem **271**(5): 2621-2626.
- Xu, K. and M. A. Strauch (1996b). "*In vitro* selection of optimal AbrB-binding sites: comparison to known *in vivo* sites indicates flexibility in AbrB binding and recognition of three-dimensional DNA structures." Mol Microbiol **19**(1): 145-158.
- Xu, K. and M. A. Strauch (2001). "DNA-binding activity of amino-terminal domains of the *Bacillus subtilis* AbrB protein." J Bacteriol **183**(13): 4094-4098.
- Yanke, L. J., H. D. Bae, L. B. Selinger and K. J. Cheng (1998). "Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria." Microbiology **144** (Pt 6): 1565-1573.
- Yao, F. and M. A. Strauch (2005). "Independent and interchangeable multimerization domains of the AbrB, Abh, and SpoVT global regulatory proteins." J Bacteriol **187**(18): 6354-6362.
- Zuber, P. and R. Losick (1987). "Role of AbrB in Spo0A- and Spo0B-dependent utilization of a sporulation promoter in *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **169**(5): 2223-2230.

7 Anhang

7.1 Klonierung und Proteinreinigung

7.1.1 Expressionsplasmide

Tabelle 7.1: Mutagenesierte pABRB-Expressionsplasmide

Bezeichnung	Ausgangsvektor	Bemerkung
pABRBSR15A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Argininrest nach Alanin an Position 15
pABRBQ55A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Glutaminrest nach Alanin an Position 55
pABRBD62A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Aspartatrest nach Alanin an Position 62
pABRBK71A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Lysinrest nach Alanin an Position 71
pABRBK76A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Lysinrest nach Alanin an Position 76
pABRBE77A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Glutamatrest nach Alanin an Position 77
pABRBE80A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Glutamatrest nach Alanin an Position 80
pABRBQ81A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Glutaminrest nach Alanin an Position 81
pABRBE85A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Glutamatrest nach Alanin an Position 85
pABRBQ87A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Glutaminrest nach Alanin an Position 87
pABRBN88A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Asparaginrest nach Alanin an Position 88
pABRBQ89A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Glutaminrest nach Alanin an Position 89
pABRBQ91A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Glutaminrest nach Alanin an Position 91
pABRBK94A	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Lysinrest nach Alanin an Position 94
pABRBQ55E	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution Glutaminrest nach Glutamat an Position 55
pABRBQ81E	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Glutaminrest nach Glutamat an Position 81
pABRBN88D	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Asparaginrest nach Aspartat an Position 88
pABRBK94I	pABRB	pABRB (AS 1-94), AS-Substitution von Lysinrest nach Isoleucin an Position 94

7.2 Klonierung: Plasmidkonstruktion

7.2.1 Konstruktion der pABBA-Plasmide

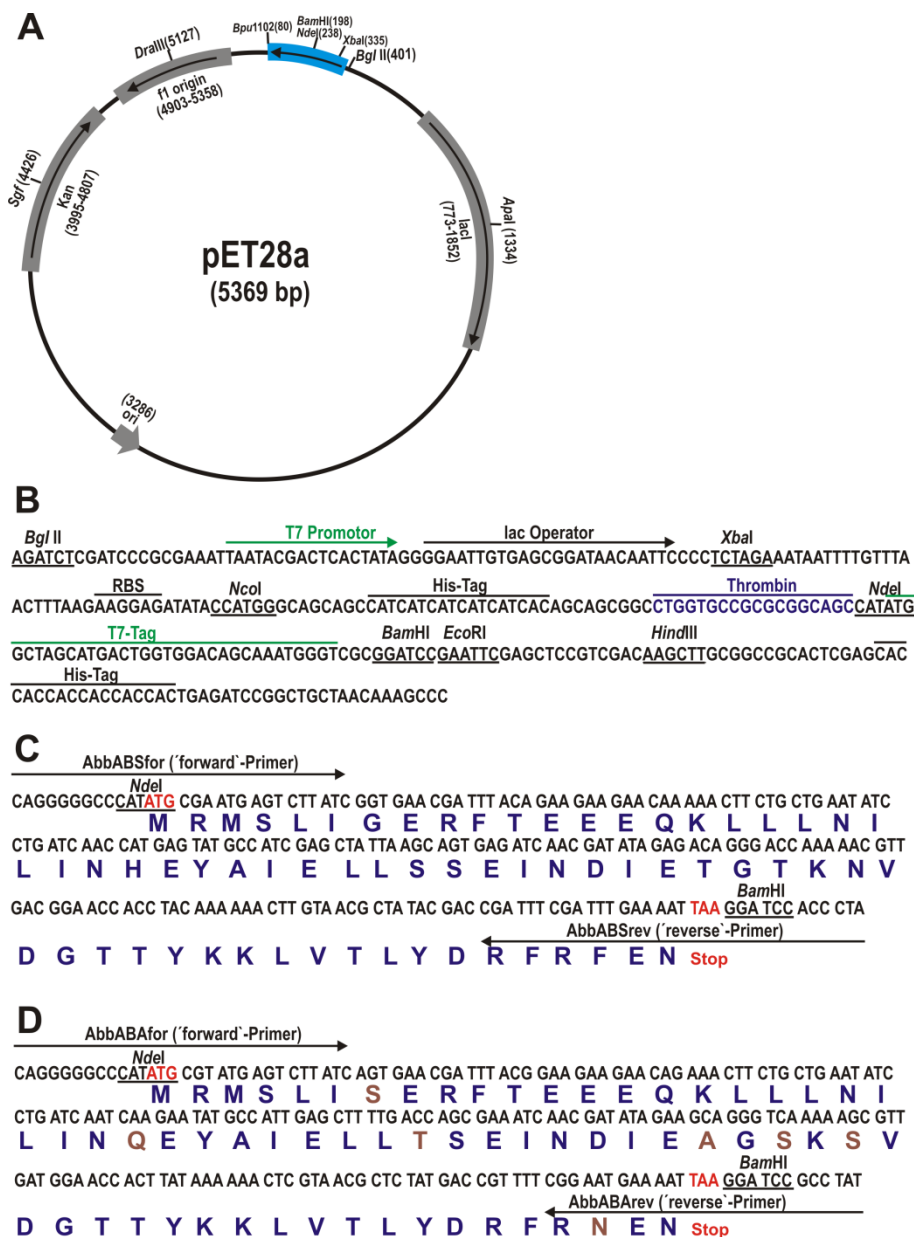


Abbildung 7.1: Konstruktion von pABBABS und pABBABA.

Der Expressionsvektor pET28a mit der Klonierungsregion (blau) für die Ligation des 198 bp langen *yzkF* (*abba*)-Gens (A). Die Klonierungsregion des pET-Systems (Novagen) (B). Das *yzkF*-Gen wurde aus *B. subtilis* 168 bzw. *B. amyloliquefaciens* FZB45 mit den entsprechenden Primern amplifiziert und nach einer Restriktion mit NdeI und BamHI in die Klonierungsregion eines Expressionsvektors pET28a ligiert (C, D). Zu jedem Basentriplett der Nukleobasensequenz ist die zugehörige Aminosäure dargestellt. Startcodon ATG und Stoppcodon TAA sind rot markiert.

Abba BS 168	MRMSLIGERFTEEEQKLLLNILINHEYAIELLSSEINDIETGTKNVDGTTYKKLVTLYDRFRFEN
Abba BA FZB45	MRMSLISERFTEEEQKLLLNILINQEYAIELLTSEINDIEAGSKSV
Abba BA FZB42	MRMSLIGERFTEEEQKLLLNILINQEYAIELLTSEINDIEAGSKSV

Abbildung 7.2: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Abba aus *B. subtilis* 168, *B. amyloliquefaciens* FZB45 und FZB42.

Die AS-Sequenzen von *B. s.* 168 und *B. a.* FZB42 sind der NCBI-Datenbank entnommen. Die AS-Sequenz von *B. a.* FZB45 ist das Ergebnis der Sequenzierung (SMB, Berlin) im Laufe des DFG-Projektes. Die grau-markierten Aminosäuren sind die Unterschiede in der Sequenz aus drei Organismen. Die AbbA-Proteine aus FZB42 und FZB45 zeigen den Unterschied nur in einer AS an Position 7, die AbbA-Proteine aus *B. s.* 168 und *B. a.* FZB45 zeigen Abweichungen der sieben Aminosäuren und die aus *B. s.* 168 und FZB42 der sechs Aminosäuren. Zwischen den AbbA-Proteinen aus *B. s.* 168 und *B. a.* FZB45 liegt eine hohe Aminosäuresequenzidentität von 89,3 %.

7.2.2 Konstruktion des pABRB-Plasmids und dessen Derivate

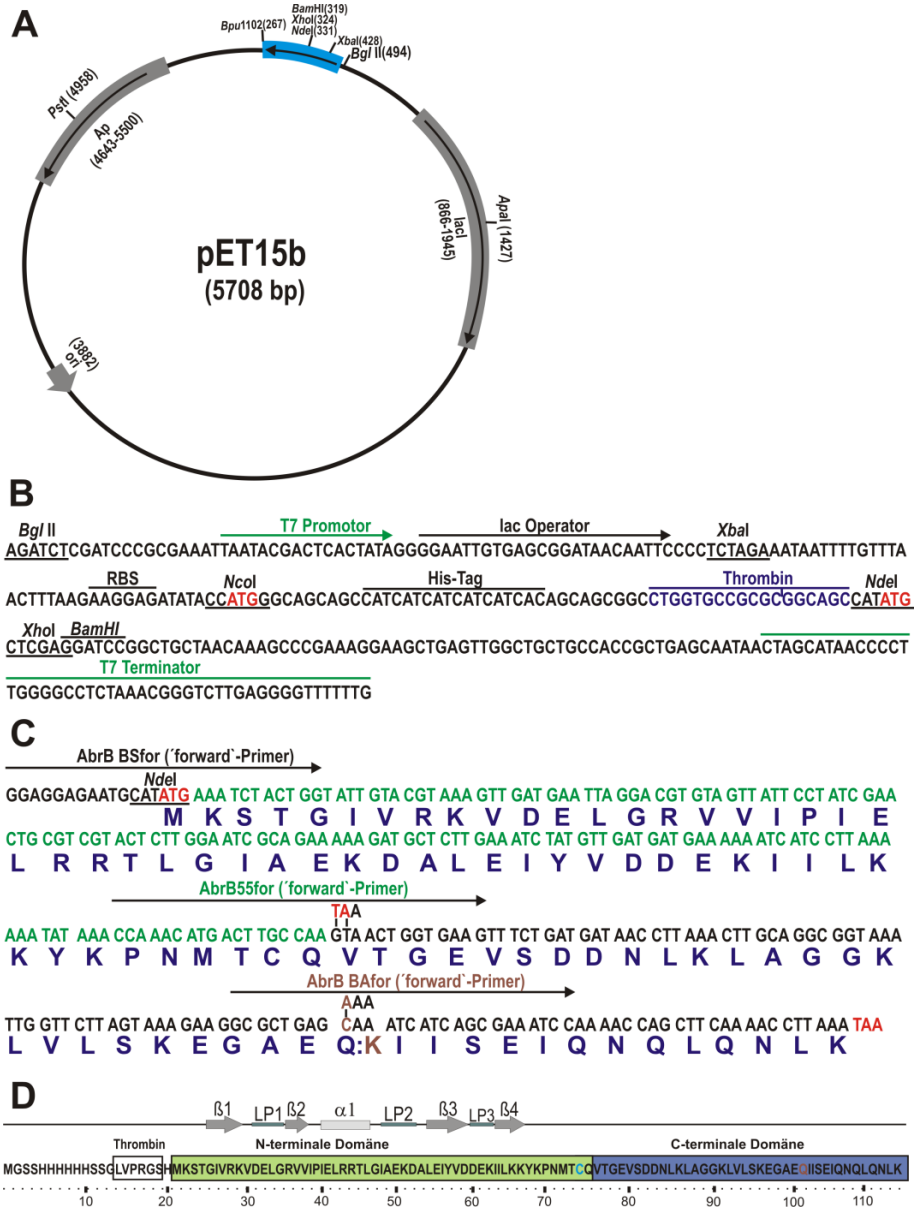


Abbildung 7.3: Konstruktion von pABRB und dessen Derivate pABRBQ81K und pABRB55.

Der Expressionsvektor pET15b mit der Klonierungsregion (blau) für die Ligation des 285 bp-langen *abrB*-Gens aus *Bacillus subtilis* 168 (A). Die Klonierungsregion von pET15b des pET-Systems (Novagen) (B). Das *abrB*-Gen wurde aus *B. subtilis* 168 mit den entsprechenden Primern amplifiziert und nach einer Restriktion mit NdeI und BamHI in die Klonierungsregion eines Expressionsvektors pET15b ligiert (Makarewicz *et al.* 2008). Das pABRB-Plasmid wurde als Ausgangsvektor für die Klonierung des Proteins AbrBQ81K (entspricht dem AbrB aus *B. a.* FZB45) und AbrBN mit dem QuickChange™ II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene mutagenisiert. Das resultierende pABRBQ81K zeigt eine Substitution CAA:AAA. Das pABRB55-Plasmid resultierte aufgrund Einführung eines Stoppcodons (Substitution GTA:TAA) innerhalb der AS-Sequenz. Die Nukleotidsequenz von *abrB55* ist grün markiert. Zu jedem Basentriplett ist die zugehörige Aminosäure dargestellt. Startcodon ATG und Stoppcodon TAA sind rot markiert (C). Die 114 AS-lange Sequenz von AbrB BS mit His-Tag: Der grün-markierte Bereich entspricht dem N-Terminus und blau dem C-Terminus. Abgeleitete Sekundärstruktur der N-terminalen Domäne von (Sullivan *et al.* 2008). Die braun markierte AS101 Glutamin zeigt an der Position bei AbrB BA ein Lysin (D).

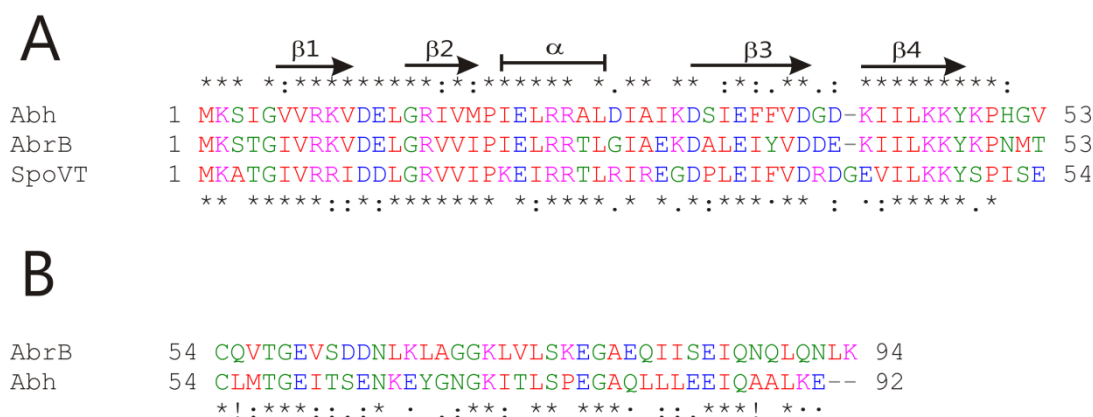


Abbildung 7.4: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der N-terminalen Domänen von AbrB, Abh und SpoVT (A) und der C-terminalen Domänen von AbrB und Abh (B).

Die bekannten Sekundärstrukturen der DNA-bindenden Domänen sind durch Pfeile (β -Faltblätter 1-4) bzw. Linie (α -Helix) gezeigt (Coles *et al.* 2005). Die Ähnlichkeiten (Sternchen, Einfach-, Doppelpunkt) für AbrB und Abh sind über und für AbrB und SpoVT unter den Sequenzen angezeigt: * = identische AS-Reste, : = konservierte AS-Reste (gleiche Farbe), . = semi-konservierte AS-Reste (ähnliche Eigenschaften, z.B. AS62, D und S sind beide hydrophil). AS-Reste sind markiert wie gefolgt: rot - hydrophobe, aromatische (F), blau - saure AS (D, E), magenta - basische AS (R, K), grün - hydrophile, neutrale, auch leicht basische (H) und aromatische mit Hydroxylgruppe (Y). Die Alignmentanalyse erfolgte mit ClustalW (DS Gene 1.5).

7.2.3 Konstruktion des pSN1-Plasmids

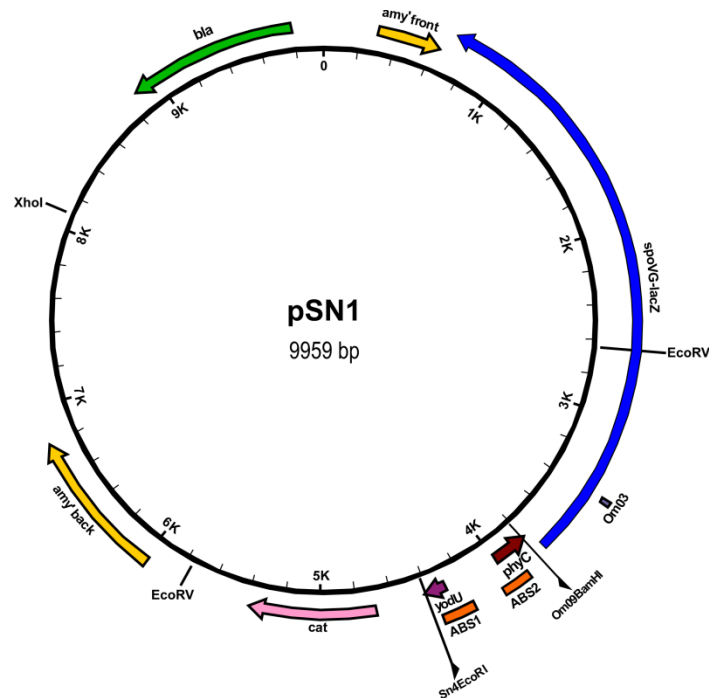


Abbildung 7.5: Das pSN1-Plasmid.

Das *phyC*-Promotorfragment wurde aus *B. amyloliquefaciens* FZB45 mit den Primern Sn4EcoRI und Om09BamHI (-392 bis +221, Position relativ zum Transkriptionsstart) amplifiziert und nach der Restriktion mit EcoRI und BamHI in den geschnittenen pDG268-Vektor ligiert. Der Vektor wurde innerhalb der ABS1-Stelle mit dem QuickChange™ II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene mutagenisiert. Die daraus resultierenden Plasmide sind pSN34-1 (TTAT→GGAG) und pSN34-2 (CCA→GGC).

7.2.4 SDS-PAGE-Reinigungsgele

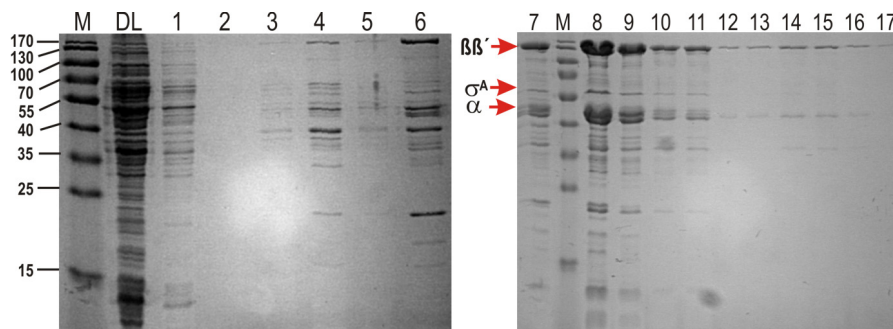


Abbildung 7.6: Reinigung der RNA-Polymerase aus *B. subtilis* 168.

10 %-ige SDS-PAGE der Reinigung über Ni^{2+} -NTA Agarosesäule. M = PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas, DL = Durchlauf, 1, 2 = 1. und 2. Waschschrift ohne Imidazol, 3, 4, 5 = Waschschrift mit 10 mM Imidazol, 6 = Waschschrift mit 30 mM Imidazol, 7 - 17 = Eluate E1 - E11. RNAP mit β - und β' -Untereinheiten mit 150 kDa, dem assoziierten σ^A -Faktor mit 55 kDa und α -Untereinheit mit 53 kDa (rote Pfeile).

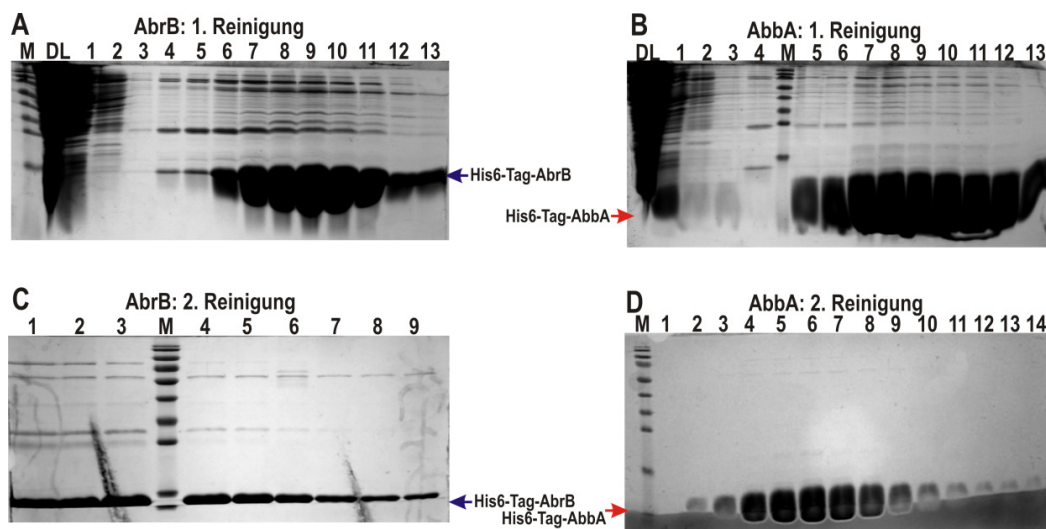


Abbildung 7.7: Die erste Reinigung der AbrB- und AbbA-Proteine aus *B. subtilis* (BS) über Ni²⁺-NTA-Agarose und die zweite Reinigung über Ni-TED 1000.

14 %-ige SDS-Gele aus erster Proteinreinigung (A und B): M = PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas, DL = Durchlauf, 1 = Waschschrift ohne Imidazol, 2 = Waschschrift mit 30 mM Imidazol, 3 = Waschschrift mit 50 mM Imidazol, 4 = Waschschrift mit 100 mM Imidazol, 5 – 13 = Eluate E1 – E14 (E1, E2, E4, E6, E8, E9, E10, E12, E14). 14 %-ige SDS-Gele von zweiter Reinigung der Proteine über Ni-TED 1000 (C und D): Die Nummerierung 1 - 3 auf dem AbrB-Gel = Eluate E5 – E7, 4 – 8 = Eluate E9 – E13 und 9 = Eluat E15. Die Nummerierung 1 – 14 auf dem AbbA-Gel = Eluate E1 – E14. Die molekulare Masse von His₆-Tag-AbrB BS betrug 12,65 kDa und von His₆-Tag-AbbA BS 9,79 kDa.

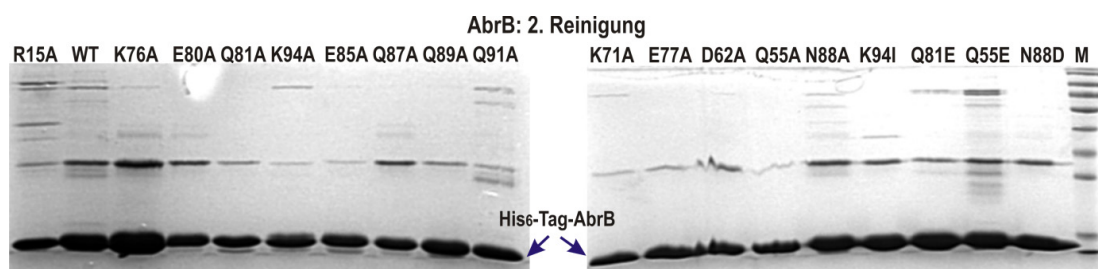


Abbildung 7.8: Die vereinigte Eluate der einzelnen AbrB-Mutanten und von AbrB-WT.

14 %-ige SDS-Gele von zweiter Reinigung der Proteine über Ni-TED 1000. Die relative Molekülmasse von His₆-Tag-AbrB BS betrug 12,65 kDa. M = PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas.

7.2.5 Proteinreinigung über präparative Gelfiltration als Vorbereitung für SAXS- und CD-Messungen

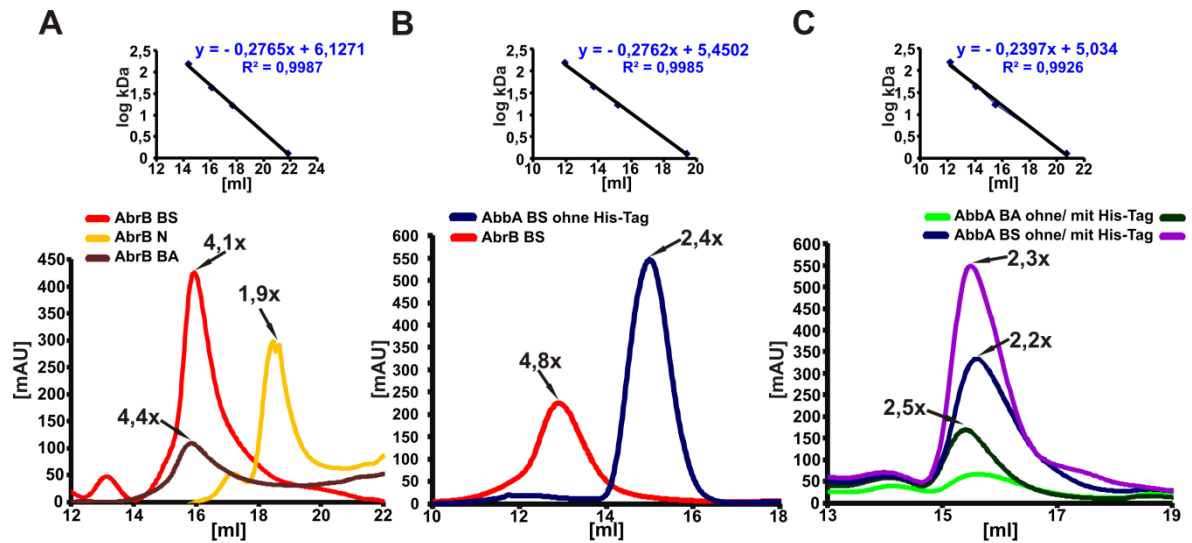


Abbildung 7.9: Chromatogramm der präparativen FPLC-Läufe von AbrB- und AbbA-Proteine.

Das Chromatogramm der Proteinläufe wurde als die Absorption [mAU] gegen das Retentionsvolumen [ml] der mobilen Phase dargestellt. Der Säulenlauf des Proteins wurde durch UV-Detektion bei 280 nm verfolgt. Zu jedem Chromatogramm wurde das dazu gehörige Kalibrierungsdiagramm mit der Regressionsgleichung dargestellt, die aus den Standard-Proteinen mit bekannten molekularen Massen abgeleitet wurde. Die Retentionsvolumina des Standards und die berechneten Logarithmen der molekularen Massen wurden gegeneinander aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Die berechneten Oligomere wurden bei den AbrB- bzw. AbbA- Peaks (Pfeile →) gezeigt. (A) Die Präparation der AbrB- Proteine für die CD-Messungen. (B) Die Proteinreinigung von His₆-AbrB BS und AbbA BS ohne His₆-Tag für die SAXS-Messungen. (C) AbbA- Proteine aus *B. subtilis* und *B. amyloliquefaciens* FZB45 mit und ohne His₆-Tag für CD-Messungen der Sekundärstruktur-Analyse.

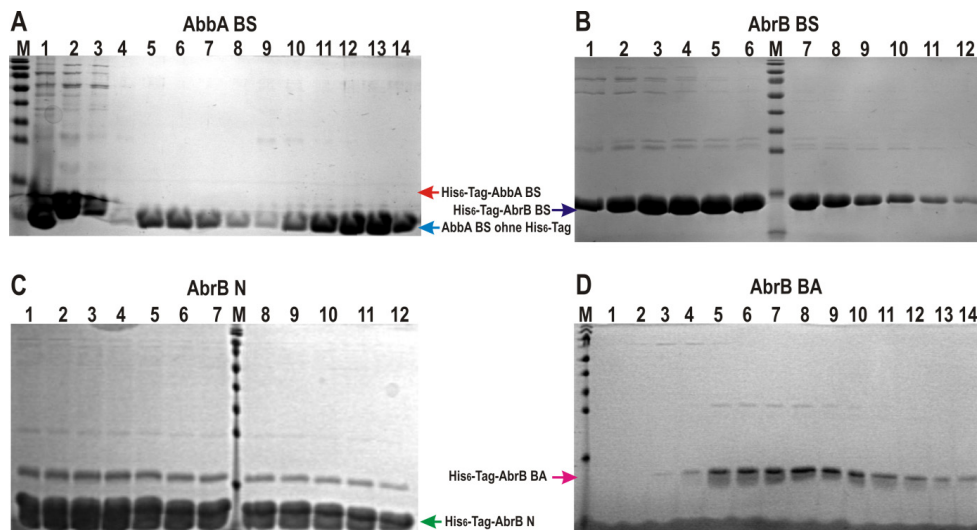


Abbildung 7.10: Überprüfung der gesammelten Proteinfraktionen nach präparativer FPLC mit Hilfe der SDS-PAGE.

14 %-ige SDS-Gele der Proteine nach der Reinigung über präparative Gelfiltration. M = PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas. Fraktionen von AbbA aus *Bacillus subtilis* (BS), Proteinpräparation für die SAXS-Messungen (A): 1 = AbbA ohne His-Tag vor dem FPLC-Lauf, 2, 3 = AbbA mit His-Tag vor dem FPLC-Lauf, 4 – 8 = Proteinfractionen von AbbA ohne His-Tag nach dem ersten FPLC-Lauf, 4 = 24. Fraktion, 5 = 26. Fraktion, 6. – 8. = 28. bis 30. Fraktion, 9 – 14 = Proteinfractionen von AbbA ohne His-Tag nach dem zweiten FPLC-Lauf, 9 – 10 = 24. bis 29. Fraktionen. Die relative Molekülmasse von AbbA mit His-Tag betrug 9,79 kDa und ohne His-Tag 7,79 kDa. Fraktionen von AbrB aus *Bacillus subtilis* (BS), Proteinpräparation für die SAXS-Messungen (B): 1 – 12 = Proteinfractionen 15 bis 26. Die molekulare Masse von AbrB mit His-Tag betrug 12,65 kDa. Fraktionen von dem verkürzten AbrB (AbrB N) aus *Bacillus subtilis*, Proteinpräparation für die CD-Messungen (C): 1 – 12 = Proteinfractionen 52 bis 63. AbrBN-Monomer mit His-Tag ist 8,49 kDa. Fraktionen von AbrB aus *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 (BA), Proteinpräparation für die CD-Messungen (D): 1 – 14 = Proteinfractionen 18, 23, 28, 33, 36, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 53, 58, 63. AbrB BA mit His-Tag ist 12,65 kDa.

7.2.6 Western Blot zum Nachweis des His₆-Tags

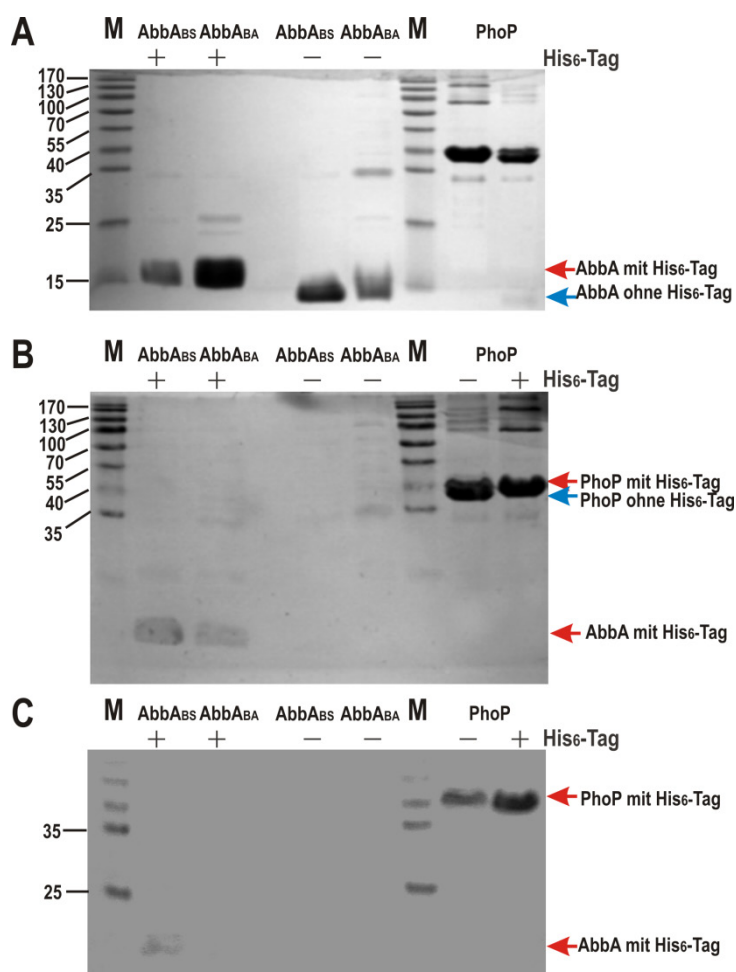


Abbildung 7.11: Die SDS-Gele und das Immunoblot von AbbA- und PhoP-Proteinen.

Das mit Coomassie-gefärbte 14 %-ige SDS-Gel mit Proteinbanden zum Nachweis von AbbA BS, AbbA BA und PhoP mit und ohne His₆-Tag (A). Die auf das Gel beladene Protein-Konzentration war 5 µg. M = PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas. Das geblottete SDS-Gel wurde zur Kontrolle mit Coomassie gefärbt, um zu zeigen, wie erfolgreich die Proteinbanden von dem Gel auf die Membran transferiert wurden (B). Die Nitrozellulose-Membran (Machery Nagel) zeigte die Proteinbanden von AbbA BS und PhoP mit His₆-Tag (C). Das His₆-Tag von PhoP-Protein wurde nach der Thrombin-Behandlung (-) nicht vollständig entfernt. Das His₆-Tag-AbbA-Protein (+) war aufgrund der kleinen Molekülmasse schwach mit Immunoblot nachzuweisen.

7.2.7 UV-Proteinbestimmung bei 280 nm

Tabelle 7.2: Wichtige Parameter zur Konzentrationsbestimmung der AbrB-Varianten.

Protein	AS-Anzahl mit His ₆ -Tag	Anzahl der aromatischen AS	m _M [kDa]* (mit His ₆ - Tag)	Extinktions- koeffizient
AbrB BS	114	2 Tyr	12,6397	2,56
R15A	114	2 Tyr	12,5546	2,56
Q55A	114	2 Tyr	12,5827	2,56
D62A	114	2 Tyr	12,5957	2,56
K71A	114	2 Tyr	12,5826	2,56
K76A	114	2 Tyr	12,5826	2,56
E77A	114	2 Tyr	12,5817	2,56
E80A	114	2 Tyr	12,5817	2,56
Q81A	114	2 Tyr	12,5827	2,56
E85A	114	2 Tyr	12,5817	2,56
Q87A	114	2 Tyr	12,5827	2,56
N88A	114	2 Tyr	12,5967	2,56
Q89A	114	2 Tyr	12,5827	2,56
Q91A	114	2 Tyr	12,5827	2,56
K94A	114	2 Tyr	12,5826	2,56
Q55E	114	2 Tyr	12,6407	2,56
Q81E	114	2 Tyr	12,6407	2,56
N88D	114	2 Tyr	12,6407	2,56
K94I	114	2 Tyr	12,6247	2,56

* mM ist die molekulare Masse mit der Masseinheit [Da] (Voet *et al.* 2002). Bei der Berechnung der molekularen Masse des Proteins wurden die Massen der einzelnen Aminosäuren der AS-Sequenz des Proteins berücksichtigt (Voet *et al.* 2002). Der AS-Austausch in AbrB-Protein aus *B. subtilis* hatte geringe Auswirkung auf die molekulare Masse.

7.3 Surface Plasmon Resonance – SPR

7.3.1 Bindungsreaktionen der ds-Oligonukleotide mit AbrB-Proteinen

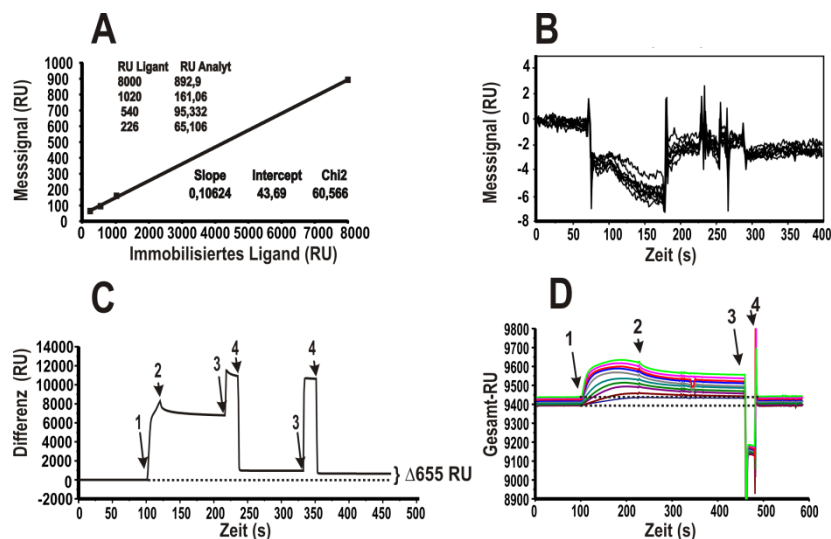


Abbildung 7.12: Darstellung der erhaltenen Sensorgramme aus SPR-Messungen.

Linearer Anstieg des Messsignals (RU) mit steigender Dichte des gebundenen Liganden (226, 540, 1020 und 8000 RU) nach Zugabe des U3-Oligonukleotids (A). Sensorgramm der Messzelle 2 (Fc2) mit dem Lysozym als Liganden (Proteinkontrolle) (B). Rekonstitution der AbrB-Oberfläche (C): (1) Basislinie auf Null gebracht und Start der Injektion von 30 μ l von 0,5 μ M AbrB bei einer Flussrate von 10 μ l/min, (2) Maximum erreicht und Basislinie stabil, (3) Erneute Injektion der Liganden, (4) anschließendes Waschen des Sensorchips, (3-4) Wiederholung. Zur Bestimmung der kinetischen Bindungsparameter wurden die Bindungssignale bei verschiedenen Analytkonzentrationen (5-100 nM) über die Zeit aufgenommen (D): (1) Beginn der Assoziation nach dem Injektionsstart, (2) Injektionsstopp und Beginn der Dissoziationsphase, (3) Beginn der Regenerierungsphase, bei der die gebundenen ds-Oligonukleotide effizient entfernt wurden, (4) Bindungskapazität der Sensorchip-Oberfläche ist wiederhergestellt.

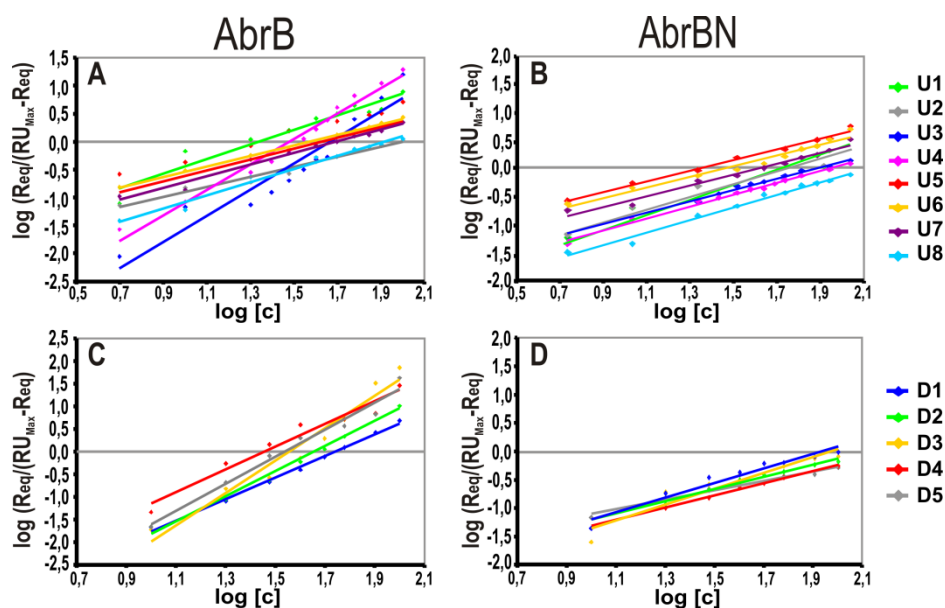


Abbildung 7.13: Lineare Hill-Auftragung von $\log[\text{Req}/(\text{RU}_{\text{max}} - \text{Req})]$ gegen $\log[\text{Analyt}]$.

Bei der linearen Funktion $y=mx+b$ war der Hill-Koeffizient n_H die Steigung (m). Der Abszissenabschnitt lieferte Dissoziationskonstante K_D (auch K_{Hill} genannt). Die Hill-Auftragung der Bindungsreaktionen von den ABS1-Oligonukleotiden mit dem *full-length* AbrB (A) und AbrBN (B). Die ABS2-Oligonukleotide in Interaktion mit dem *full-length* AbrB (C) und AbrBN (D). R_{eq} -Werte entsprechen den im *steady-state* abgelesenen RU-Antworten zu gegebener Analytkonzentration. RU_{max} entspricht dem theoretischen Gleichgewichtszustand bei unendlich hoher Analytkonzentration.

7.3.2 Bindungsreaktionen von AbrB mit seinem Antirepressor AbbA

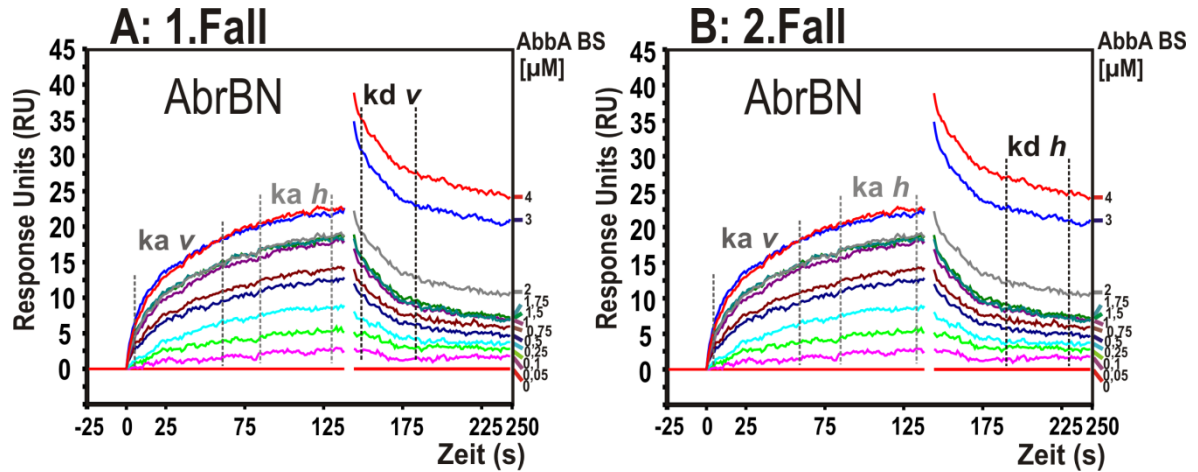


Abbildung 7.14: Lokales und separates Anpassen von k_a/k_d -Geschwindigkeitskonstanten mit 1:1 Langmuir-Bindungsmodell.

Die Auswertung der Geschwindigkeitskonstanten erfolgte mit dem *separate* k_a/k_d 1:1 Langmuir-Modell von jeder einzelnen Kurve. Die separate Auswertung der von k_a verlangte zuerst die Berechnung der k_d -Werte. Dabei wurden die unterschiedlichen Bereiche der Dissoziations- bzw. Assoziationsphasen genommen. Beim ersten Fall (A) wurde der vordere Bereich der Dissoziationskurve für die Berechnung des k_d -Wertes ($k_{d v}$) genommen und mit dem Wert die k_a -Geschwindigkeitskonstanten aus unterschiedlichen Assoziationsbereichen bestimmt. Der Sensorgramm der Interaktionen zwischen AbrBN und AbbA BS wurde als Beispiel präsentiert. Beim zweiten Fall (B) wurde der hintere Bereich der Dissoziationskurve ($k_{d h}$) genommen.

Tabelle 7.3: Die berechneten Reaktionsraten aus den beiden Fällen für die Interaktionen zwischen *full-length* AbrB bzw. AbrBN und dem Antirepressor AbbA.

BS = *Bacillus subtilis* 168, BA = *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45. Die Gleichgewichtskonstanten der Assoziation und der Dissoziation ergaben sich als Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten.

1:1 Langmuir- Bindung						
	AbrB BS:AbbA BS		AbrB N:AbbA BS		AbrB BA:AbbA BA	
	1. Fall $k_{d v}$	2. Fall $k_{d h}$	1. Fall $k_{d v}$	2. Fall $k_{d h}$	1. Fall $k_{d v}$	2. Fall $k_{d h}$
k_{d1} (1/s)	$3,59 \times 10^{-3}$	$4,96 \times 10^{-4}$	$1,77 \times 10^{-2}$	$3,27 \times 10^{-3}$	$5,54 \times 10^{-3}$	$2,02 \times 10^{-3}$
$k_{a v}$ (1/Ms)	$1,52 \times 10^5$	$1,38 \times 10^5$	$3,22 \times 10^4$	$3,74 \times 10^4$	$5,18 \times 10^4$	$5,55 \times 10^4$
$k_{a h}$ (1/Ms)	$1,17 \times 10^4$	$8,48 \times 10^4$	$2,05 \times 10^4$	$1,19 \times 10^4$	$4,62 \times 10^3$	$1,12 \times 10^4$
$K_{a v}$ (1/M)	$9,06 \times 10^7$	$1,86 \times 10^8$	$2,62 \times 10^6$	$1,03 \times 10^7$	$1,24 \times 10^7$	$3,72 \times 10^7$
$K_{a h}$ (1/M)	$4,28 \times 10^6$	$1,03 \times 10^8$	$1,16 \times 10^6$	$1,11 \times 10^7$	$8,13 \times 10^5$	$4,59 \times 10^6$
$K_{D v}$ (M)	$1,51 \times 10^{-7}$	$1,91 \times 10^{-8}$	$5,16 \times 10^{-7}$	$1,22 \times 10^{-7}$	$1,32 \times 10^{-7}$	$3,56 \times 10^{-8}$
$K_{D h}$ (M)	$7,10 \times 10^{-7}$	$1,05 \times 10^{-7}$	$2,27 \times 10^{-6}$	$3,86 \times 10^{-7}$	$1,58 \times 10^{-6}$	$2,99 \times 10^{-7}$
χ^2 (%)	0,45	0,59	0,64	0,58	0,61	0,93

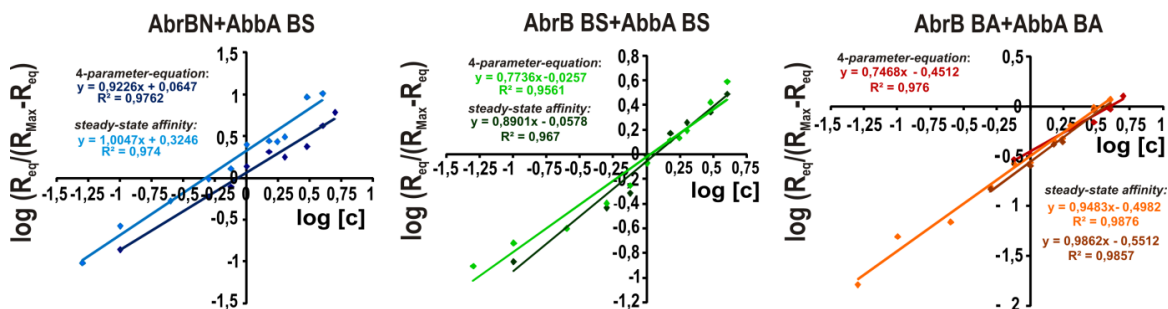


Abbildung 7.15: Lineare Hill-Auftragung von $\log[R_{eq}/(R_{max}-R_{eq})]$ gegen $\log[Analyt]$.

Bei der linearen Funktion $y=mx+b$ war der Hill-Koeffizient n_H die Steigung (m). Der Abszissenabschnitt lieferte apparent Dissoziationskonstante K_{app} . Die Bindungsdaten wurden mit beiden *general fitting*-Modellen ausgewertet und die daraus abgeleiteten R_{max} -Werte für die Hill-Darstellung verwendet. R_{eq} -Werte entsprechen den im *steady-state* abgelesenen RU-Antworten zu gegebener Analytkonzentration. R_{max} entspricht dem theoretischen Gleichgewichtszustand bei unendlich hoher Analytkonzentration.

Tabelle 7.4: Die kinetischen und thermodynamischen Parameter der AbrB-AbbA-Interaktionen.

Die Berechnung erfolgt mit zwei Bindungsmodellen *Bivalent-Analyte* und *Two-State-Reaction* der BIAevaluation Software Version 3.1. Bei dem *Bivalent-Analyte*-Modell hat k_{a2} die Einheit $[RU^{-1}s^{-1}]^{**}$ und K_A (Gesamt) die Einheit $[RU^{-1}M^{-1}]^*$ und bei der *Two-State-Reaction* ist k_{a2} mit Einheit $[s^{-1}]$ unabhängig von der Molarität. BS = *Bacillus subtilis* 168, BA = *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45. SE sind die Standardfehler zu den kinetischen Parametern.

	AbrB BS:AbbA BS		AbrB BA:AbbA BA	
	<i>bivalent analyte</i>	<i>two-state reaction</i>	<i>bivalent analyte</i>	<i>two-state reaction</i>
k_{a1} (1/Ms)	$5,02 \times 10^4$	$1,58 \times 10^5$	$8,22 \times 10^4$	$1,32 \times 10^5$
SE (k_{a1})	$1,25 \times 10^1$	$1,88 \times 10^1$	$1,04 \times 10^2$	$4,17 \times 10^2$
k_{d1} (1/s)	$1,28 \times 10^{-3}$	$1,57 \times 10^{-1}$	$2,54 \times 10^{-3}$	$9,55 \times 10^{-2}$
SE (k_{d1})	$8,16 \times 10^{-8}$	$2,76 \times 10^{-5}$	$2,92 \times 10^{-6}$	$3,4 \times 10^{-4}$
k_{a2} (1/RUs)**	$3,82 \times 10^{-2}$	$2,99 \times 10^{-2}$	$2,78 \times 10^{-2}$	$1,78 \times 10^{-2}$
SE (k_{a2})	$6,53 \times 10^{-6}$	$9,98 \times 10^{-6}$	$3,7 \times 10^{-5}$	$6,48 \times 10^{-5}$
k_{d2} (1/s)	$4,96 \times 10^{-2}$	$1,16 \times 10^{-3}$	$2,25 \times 10^{-2}$	$1,58 \times 10^{-3}$
SE (k_{d2})	$2,03 \times 10^{-6}$	$4,65 \times 10^{-7}$	$3,37 \times 10^{-5}$	$5,55 \times 10^{-6}$
K_{A1} (1/M)	$5,71 \times 10^7$	$1,01 \times 10^6$	$3,34 \times 10^7$	$1,33 \times 10^6$
$K_{A(Gesamt)}$ (1/M)*	$6,89 \times 10^6$	$4,05 \times 10^8$	$3,18 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
K_{D1} (M)	$5,94 \times 10^{-8}$	$1,23 \times 10^{-6}$	$3,45 \times 10^{-8}$	$7,91 \times 10^{-7}$
$K_{D(Gesamt)}$ (M)	$1,45 \times 10^{-7}$	$4,78 \times 10^{-8}$	$3,14 \times 10^{-8}$	$6,89 \times 10^{-8}$
χ^2 [%]	0,45	0,17	0,65	0,19

7.4 Zirkulardichroismus

7.4.1 Zusatzmaterial: Tabellen und Abbildungen

Tabelle 7.5: Prozentuale Darstellung der Sekundärstrukturelemente der AbrB- und AbbA-Proteine.

Die Auswertung erfolgte mit algorithmischen Programmen CDSSTR, CONTIN und SELCON3 von *online* DichroWeb-Server. BS = *Bacillus subtilis* 168, BA = *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45. α_R : reguläre α -Helix, α_D : deformierte α -Helix, β_R : reguläre β -Faltblattstruktur, β_D : deformierte β -Faltblattstruktur. *AbbA-Proteine ohne His-Tag. Die prozentuale Angabe zu AbrBN₅₃ wurde aus der NMR-Struktur (Sullivan *et al.* 2008) berechnet.

	α -Helix		β -Faltblatt		β -Turn	natively disordered	NRMSD
	α_R	α_D	β_R	β_D			
AbrBN₅₃ Sullivan <i>et al.</i> 2008 (NRM)	13,20%		47,20%		22,60%	17%	
AbrBN	1,10%	4,70%	22,20%	11,30%			
Total	5,80%		33,50%		18,30%	41,50%	0,06
AbrB BS	6,50%	7,80%	18,80%	10,40%			
Total	14,20%		29,20%		18,80%	36,60%	0,1
AbrB BA	4,20%	6,30%	21,80%	11,10%			
Total	10,50%		32,90%		19,50%	36,80%	0,08
AbbA BS*	38,80%	20,60%	5,30%	4,30%			
Total	59,30%		9,60%		11,90%	19,30%	0,08
AbbA BA*	36,80%	19,80%	6,10%	4,90%			
Total	56,60%		11%		12,90%	19,80%	0,08
AbbA BS	31,90%	20,10%	5,90%	4,90%			
Total	52%		10,80%		15,10%	22,60%	0,06
AbbA BA	41,10%	19,50%	6,20%	4,10%			
Total	60,60%		10,30%		10%	19,60%	0,08

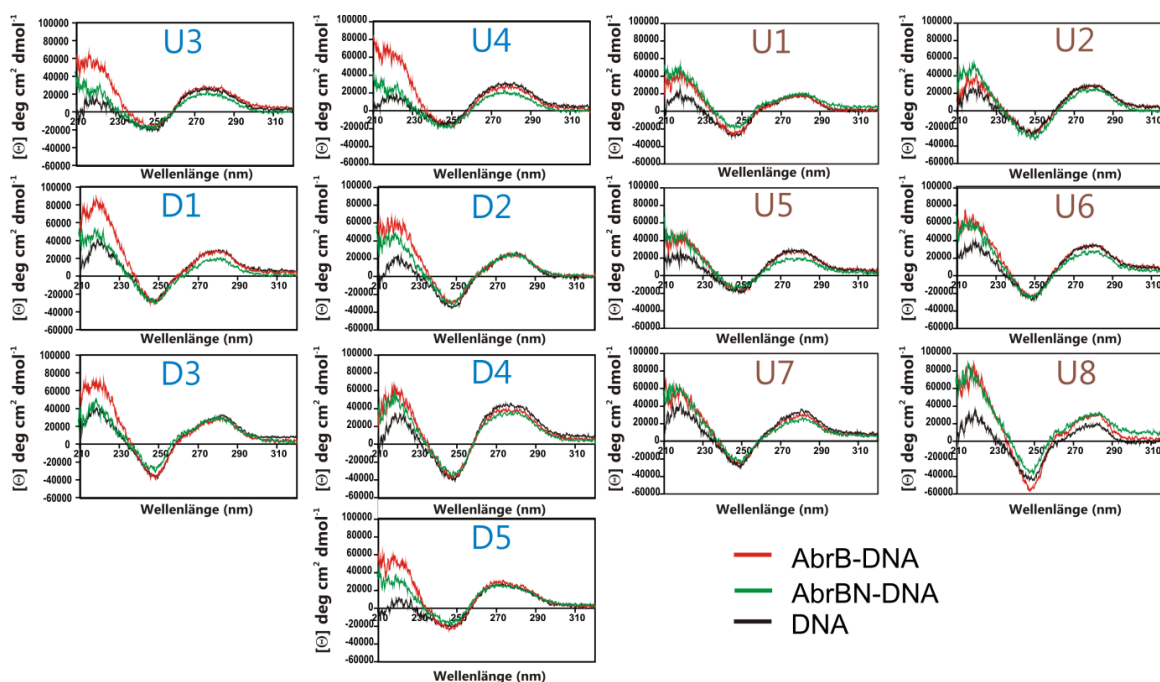


Abbildung 7.16: CD-Spektren der freien DNA-Oligonukleotide und der Protein-DNA-Komplexe.

Die Proteinspektren wurden dafür von den Spektren der DNA-Protein-Komplexen subtrahiert. Die resultierenden CD-Spektren wurden mit denen von freier DNA verglichen. Für die Bindungsassays wurden 20 μM AbrB und 2,5 μM DNA (2 AbrB₄:1 DNA) genommen. Zehn Scanspektren wurden von jeder Probe (Puffer, DNA, Protein, Komplex) akkumuliert und gemittelt. Alle Scans liefen von 320 bis 200 nm. Der Spektrumverlauf erfolgte in [mdeg] und wurde in mittlere molare Elliptizität [θ] pro Basenpaarenrest mit Einheit [$\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$] umgerechnet.

Tabelle 7.6: Sekundärstrukturelemente der His₆-AbbA-Proteine.

Die Auswertung erfolgte mit algorithmischen Programmen CDSSTR, CONTIN und SELCON3 von *online* DichroWeb-Server. AbbA BS bzw. BA mit His₆-Tag besteht aus 85 AS. Die Aminosäureanzahl für berechnete Sekundärstruktur wurde aus der Prozentigkeit, bezogen auf die Gesamtproteinlänge, ermittelt.

	α -Helix		β -Faltblatt		β -Turn		<i>natively disordered</i>	
	AS	%	AS	%	AS	%	AS	%
AbbA BS	44,2	52	9,2	10,8	12,8	15,1	19,2	22,6
AbbA BA	51,5	60,6	8,8	10,3	8,4	10	16,7	19,6

7.5 Mutagenese der C-terminalen Domäne

7.5.1 Bindungsuntersuchungen der *sinIR*-P1 mit AbrB-Varianten

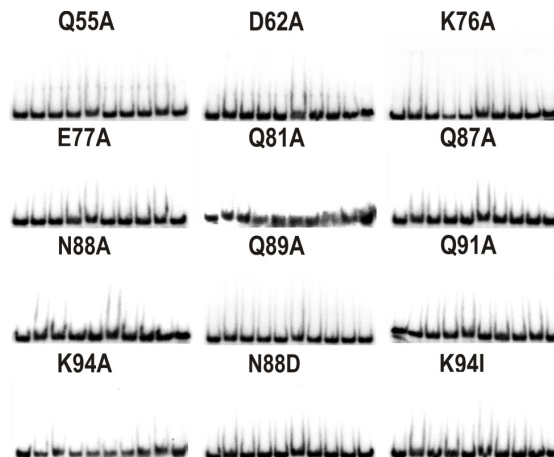


Abbildung 7.17: Gelretardationsassays der ^{32}P -markierten 36 bp-langen *sinIR*-AbrB-Bindungsstelle.

Das PCR-Produkt aus den Primern SinIRAbrBfor und SinIRAbrBrev, Position +22 bis +55 relativ zum Transkriptionsstartpunkt von P1-Promotor dargestellt. Die Bindungsreaktionen erfolgten mit 10.000 cpm markierter DNA pro Ansatz (0,95 nM als Endkonzentration) und steigenden Konzentrationen der AbrB-Substitutionsmutanten.

7.5.2 Quantifizierung der Gel-Shift-Assays

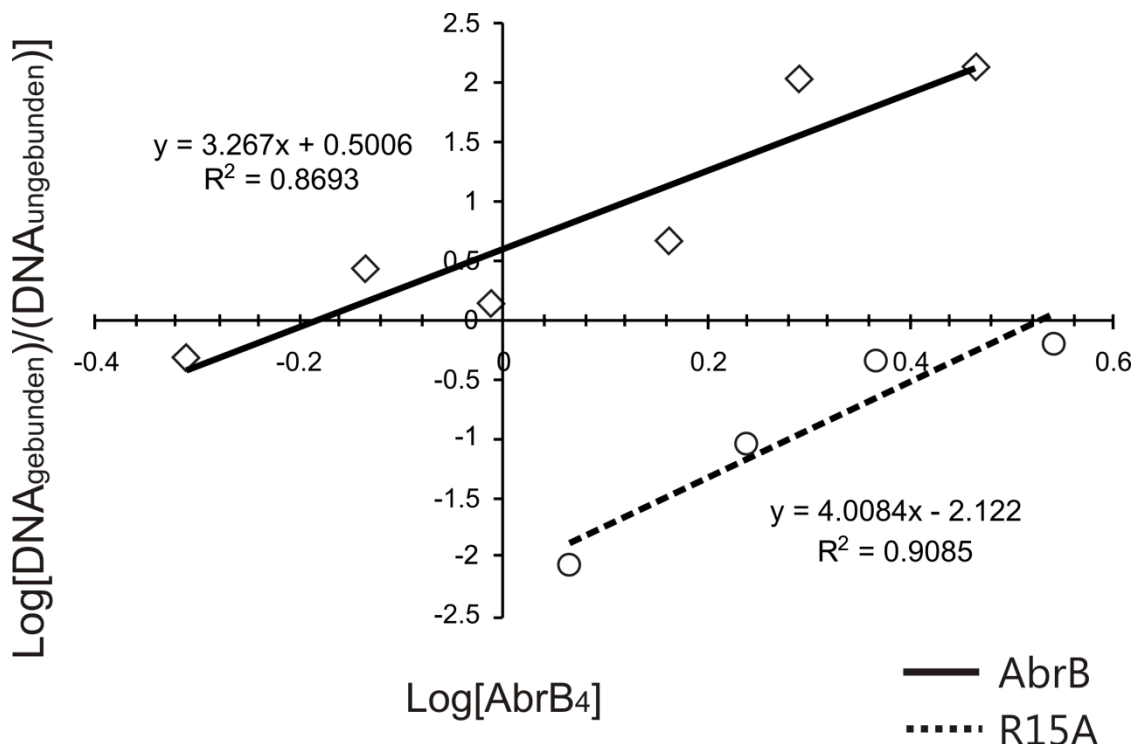


Abbildung 7.18: Bestimmung der *apparent* Dissoziationskonstante (K_{app}) von WT-AbrB und der R15A-Substitutionsmutante.

Die optischen Dichten der freien *phyC*-DNA und des AbrB-DNA-Komplexes waren als Funktionsgraph des dekadischen Logarithmus als $\log[\text{DNA}_{\text{gebunden}}]/(\text{DNA}_{\text{ungebunden}})]$ gegen $\log[\text{AbrB}_4]$ dargestellt. K_{app} -Werte waren aus dem Abszissenabschnitt abgeleitet.

7.5.3 Polymere Formen der AbrB-Varianten

Tabelle 7.7: Molekularen Massen [kDa] mit Standardabweichung und daraus resultierenden polymeren Formen (n) der AbrB-Varianten aus *B. subtilis*.

Die polymeren Formen (n) wurden unter Berücksichtigung der molekularen Masse jeder einzelnen AbrB-Variante berechnet (Tabelle 7.2). Die Prozentigkeit der einzelnen polymeren Zustände war aus dem Peak-Flächeninhalt von jedem Chromatogramm berechnet.

AbrB	kDa	n	%
wt	51,2±5,68	4,1	87
	102,8±4,99	8,2	13
R15A	50,9±2,95	4,1	57,5
	99,1±5,76	8	42,5
Q55A	50±2,99	3,9	92
	102,8±4,99	8,1	8
D62A	51,8±3,09	4,1	94
	102,8±4,99	8,2	6
K71A	53,6±2,6	4,3	86
	106,4±5,17	8,5	14
K76A	50,6±3	4	~100
E77A	51,8±3,75	4,1	83
	102,8±4,99	8,2	17
E80A	49,2±2,32	3,9	78
	102,5±4,84	8,2	22
Q81A	55,5±3,31	4,4	94
	106,4±5,17	8,5	6
E85A	50±4,05	4	98
	102,8±4,99	8,2	2
Q87A	56,7±3,38	4,5	93
	101,5±4,91	8,1	7
N88A	57,1±2,78	4,5	91
	102,3±4,98	8,1	9
Q89A	61,1±3,65	4,8	93
	102,3±4,98	8,1	7
Q91A	59,4±3,55	4,7	85
	102,8±4,99	8,2	15
K94A	51,2±3,05	4,1	93
	102,8±4,99	8,2	7
Q55E	54,2±2,61	4,3	49
	155,8±7,52	12,3	51
Q81E	49,2±3,37	3,9	78
	102,5±4,84	8,1	22
Q81K	50,1±4,86	4	~100
N88D	51,2±3,6	4,1	93
	105±5,08	8,3	8
K94I	59,1±3,65	4,7	70
	171,4±8,3	13,6	30

7.6 AbrB-AbbA-Interaktionen

7.6.1 Gelretardationsassays der *phyC*-Promotorregion

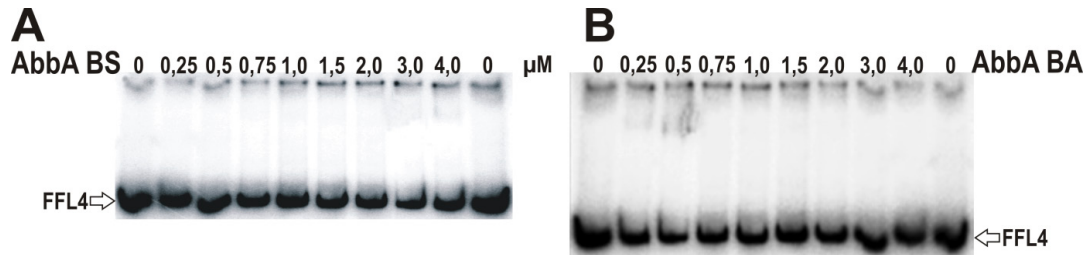


Abbildung 7.19: Gelretardationsassays des ^{32}P -markierten *phyC*-Promotorfragments FFL4 in Gegenwart von AbbA aus *B. subtilis* (A) bzw. *B. amyloliquefaciens* (B).

FFL4 war das PCR-Produkt von Sn4 und F3rev, 523 bp lang, -392 bis +131 relativ zum Transkriptionsstartpunkt von *phyC*-Promotor. Die Bindungsreaktionen erfolgten mit 12000 cpm markierter DNA pro Ansatz (0,37 nM als Endkonzentration) und steigenden AbbA-Konzentrationen [μM]. Die weißen Pfeile zeigen freie FFL4-DNA. Unter der Betreuung wurden diese Bindungsassays von Olga Dolgova durchgeführt (Dolgova 2011).

7.7 *In vitro* Transkription

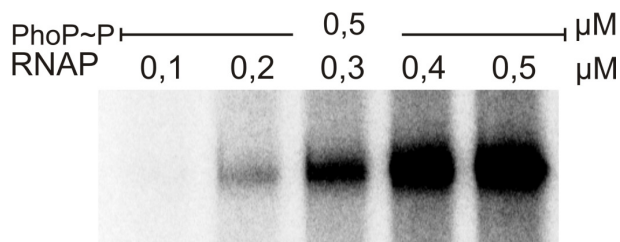


Abbildung 7.20: *In vitro* Transkriptionskontrollgel zur Überprüfung der RNAP-Aktivität.

Die frischgereinigte RNA-Polymerase wurde auf ihre Aktivität bei der *in vitro* Transkription überprüft. Dafür wurden 10 nM FFL1 als DNA-Template, 500 nM PhoP~P und unterschiedliche RNAP-Konzentrationen genommen. Die RNAP zeigte bei der Konzentration von 300 nM eine sichtbare Aktivität. Diese Konzentration wurde für ihre weiteren Transkriptionsreaktionen genommen.

7.8 Zusatzmaterial

7.8.1 Untersuchung der *phyC*-Zwischenregion bei AbrB-*phyC*-Interaktionen

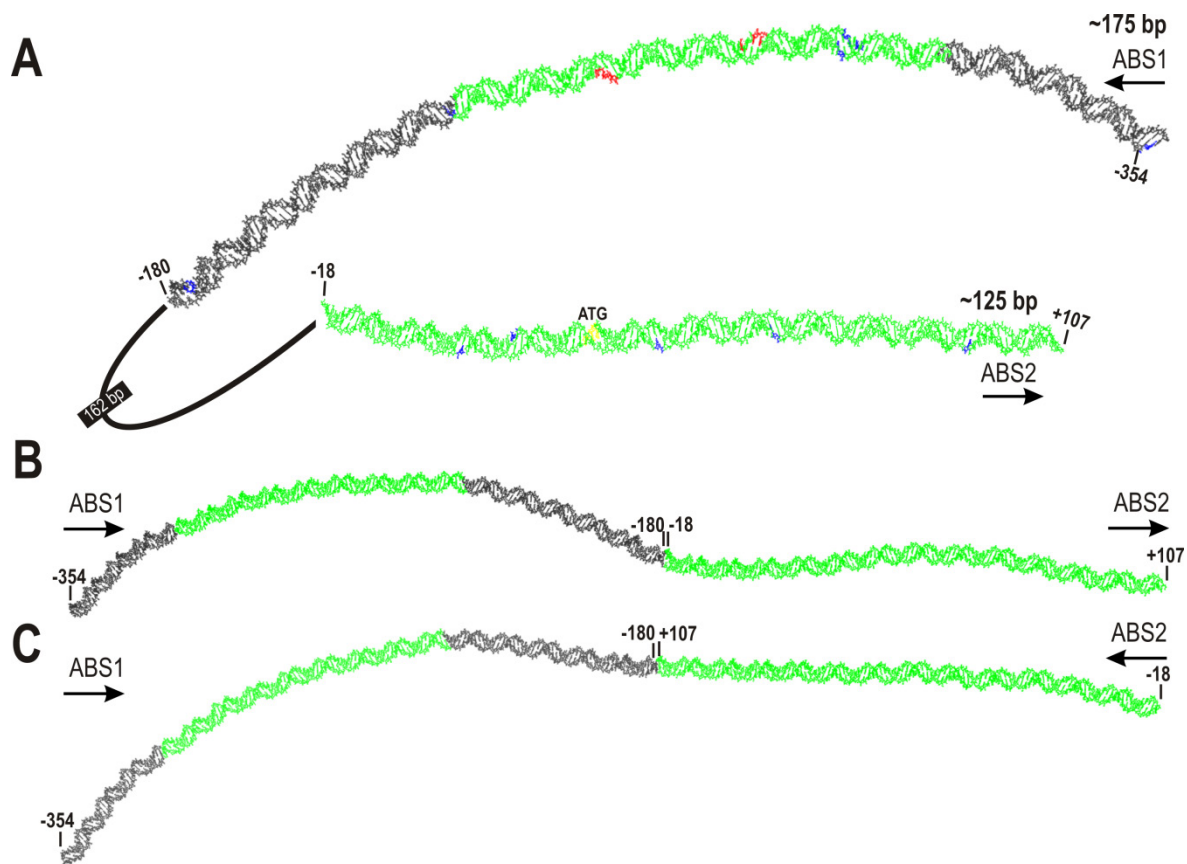


Abbildung 7.21: DNA-Doppelhelix der *phyC*-Promotorvarianten.

Die unterschiedlichen *phyC*-Promotorkonstrukte wurden für *in vitro* Bindungsassays mit AbrB verwendet. (A) Die *full-length phyC*-DNA, die beiden AbrB-Bindungsstellen, ABS1 und ABS2, und die Zwischenregion von 162 bp umfasst: Die grünen Bereiche kennzeichnen die kooperative Regionen und der graue Bereich von ABS1 nicht-kooperative Regionen mit schwachen AbrB-Kontakten. Die dargestellte Kernregion innerhalb ABS1 wurde aus den chemischen Footprint-Assays abgeleitet. Die rot markierten Basen stellen die Substitutionen (34-1 und 34-2; Abbildung 2.14) und die blau markierten Basen die hypersensitiven DNaseI- und KMnO₄-Bereiche dar. Die Pfeile zeigen die Leserichtung des *phyC*-Gens an. (B) Die Distanz zwischen den beiden ABS wurde auf 'Null' verkürzt, dabei die richtige Orientierung der ABS beibehalten. (C) Die Distanz zwischen den beiden ABS wurde auf 'Null' verkürzt und die Orientierung der ABS zueinander verändert. Unter der Betreuung wurden die DNA-Konstrukte und Bindungsassays von F. Shakola (Shakola 2010) durchgeführt. Die Vorhersage des 3D-Modells der DNA-Doppelhelix erfolgte mit dem *online* Server http://hydra.icgeb.trieste.it/dna/model_it.html (Munteanu *et al.* 1998).

7.8.2 Fluoreszenz

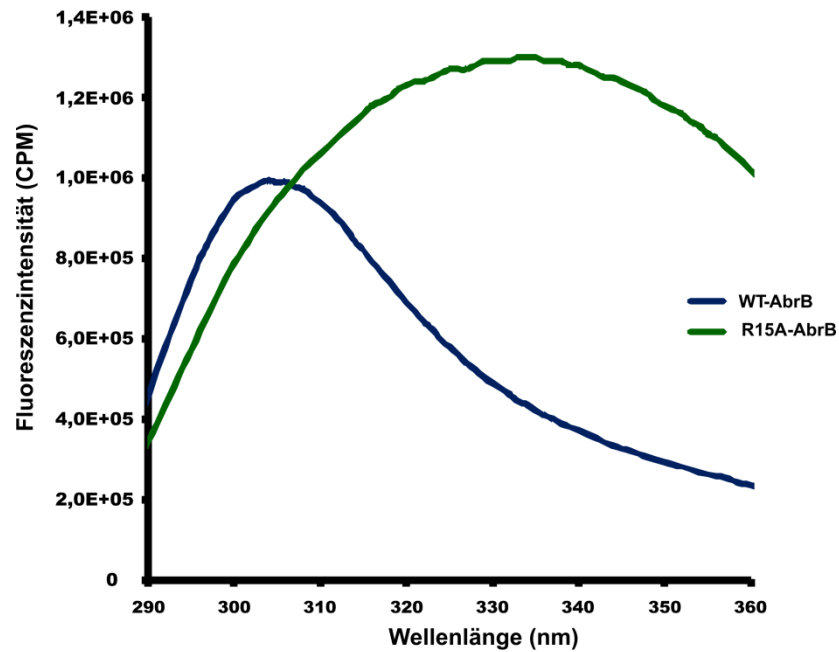


Abbildung 7.22: Fluoreszenzspektren von WT-AbrB und R15A-Mutante aus *B. subtilis*.

Die Tyrosin-Fluoreszenz wurde bei Anregungswellenlänge von 276 nm induziert und die Emissionsspektren wurden im Bereich zwischen 295 und 365 nm aufgenommen. AbrB besitzt zwei Tyrosinreste (Y37 und Y48). Das Fluoreszenzmaximum von WT-AbrB ist bei 303 nm und von R15A nahe 340 nm. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des FluoroMax-4 Spektrophotometers von Jobin Yvon.

Veröffentlichungen

Publikationen

Oliwia Makarewicz, Svetlana Neubauer, Corinna Preusse and Rainer Borriss (2008) **Transition state regulator AbrB inhibits transcription of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 phytase through binding at two distinct sites located within the extended *phyC*-promoter region.** J Bacteriol, Vol. 190(19):6467-6474.

Svetlana Neubauer, Rainer Borriss and Oliwia Makarewicz (2012) **Thermodynamic and molecular analysis of the AbrB-binding sites within the *phyC*-region of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45.** Mol Genet Genomics, Vol. 287(2):111-122.

Svetlana Neubauer, Olga Dolgova, Gregory Praeg, Rainer Borriss, and Oliwia Makarewicz (submission on July 15, 2013) **Substitutional analysis of the C-terminal domain of AbrB revealed its essential role in DNA-binding activity.** J Bacteriol, manuscript number JB00849-13.

Poster

Oliwia Makarewicz, Svetlana Neubauer, Corinna Preuß and Rainer Borriss (2007) ***Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 phytase gene transcription is directed by PhoP, AbrB and CcpA.** 4th conference on functional genomics of gram-positive microorganisms, in Tirrenia, Pisa, Italy.

Svetlana Neubauer, Elena Bolgert, Oliwia Makarewicz and Rainer Borriss (2008) **Negative regulation of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 phytase gene by the global transient phase regulator protein, AbrB.** 27th symposium on mechanisms of gene regulation, Burg Ludwigstein, Witzenhausen.

Oliwia Makarewicz, Svetlana Neubauer, Rainer Borriss (2009) **A model of the DNA-binding of the global regulator AbrB to the *phyC*-region.** VAAM, Bochum.

Oliwia Makarewicz, Svetlana Neubauer, Rainer Borriss (2010) **Thermodynamic and molecular analysis of the AbrB binding sites within the *phyC* promoter.** VAAM, Hannover.

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön geht an alle, die mich bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

In erster Linie möchte ich Herrn Prof. R. Borriss danken, für die Vergabe des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können.

Besonders verbunden fühle ich mich der Frau Dr. Oliwia Makarewicz (Universitätsklinikum Jena) für ihre engagierte Betreuung, ihre stete Diskussionsbereitschaft und ein gemeinsames Verfassen der wissenschaftlichen Manuskripte.

Ein besonderer Dank geht an Prof. W. Lockau, Luiza Seeliger und Dr. Anke Licht für die konstruktive Kritik und Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei diversen technischen Aufgaben im Labor, sowie bei den Bestellungen der Arbeitsmaterialien stand mir Christiane Müller immer mit Rat und Tat zur Seite. Für eine freundliche Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe der Bakteriengenetik ausdrücklich bedanken.

Besonderer Dank geht an die Frau Sabine Nicklisch der AG Biochemie (HUB) für die kompetente Betreuung bei der Aufreinigung der Proteine mittels FPLC.

Ich danke den Diplomanden und Bachelorstudenten: Olga Dolgova, Elena Bolgert, Gregory Praeg und Felitsiya Shakola für ihre hilfreiche Unterstützung.

Dr. Tobias Werther von FMP (Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie) danke ich für die technische Einweisung der Biacore-Methode sowie auch Heike Nikolenko (FMP) für die experimentelle Einführung in die CD-Spektroskopie.

Besonders erfreute ich mich über die Möglichkeit die Messungen direkt an X33-BioSAXS *beamline* (EMBL, Hamburg) mit Prof. Manfred Roessle als Kooperationspartner durchführen und anschließend die SAXS-Strukturen auswerten zu können.

Des Weiteren danke ich Dipl. Ing. Frank Steiniger (EMZ, Friedrich-Schiller-Universität, Jena) für die technische Einweisung in die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).

Prof. E. Schneider der AG Bakterienphysiologie danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des FluoroMax-4 Spektrophotometers von Jobin Yvon. Seinen Mitarbeitern (Dr. Daniela Weidlich, Heidi Landmesser, Dr. Anke Licht, Steven Wuttge) danke ich vor allem für ihre große Unterstützung in der Zeit nach der Auflösung der AG Bakteriengenetik.

Prof. T. Eitingen der AG Mikrobiologie danke ich für die Zurverfügungstellung des Szintillationszählers.

Anschließend, aber nicht zuletzt möchte ich mich bei den Mitgliedern des Promotionsausschusses und den Gutachtern für ihre Zusagen und Entgegenkommen, sowie bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung dieses Projektes bedanken.

Meiner Familie und Freunden danke ich dafür, dass sie mir immer zur Seite gestanden haben.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Literatur und den aufgeführten Hilfsmitteln verfasst habe.

Berlin, den 14.01.2014

Svetlana Neubauer
